(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120040601 A
(43)申请公布日 2025.05.27

(21)申请号 202510197781.6

(22)申请日 2019.05.03

(30)优先权数据
1807378.3 2018.05.04 GB
1807376.7 2018.05.04 GB

(62)分案原申请数据
201980044956.2 2019.05.03

(71)申请人 斯拜生物技术有限公司
地址 英国牛津郡牛津

(72)发明人 苏米·比斯瓦斯 金菁
丽贝卡·爱丽丝·达布斯
吉纳维芙·玛丽·凯瑟琳·拉贝

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 张晨 郑霞

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
A61K 39/245(2006.01)
A61K 39/155(2006.01)
A61P 31/20(2006.01)
A61P 31/22(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
A61K 39/385(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)

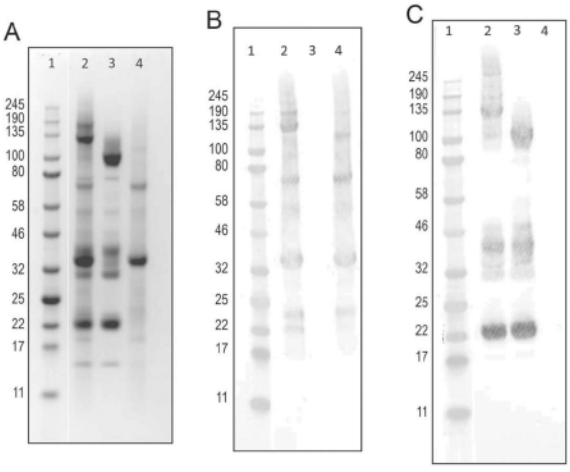
权利要求书2页 说明书31页
序列表（电子公布） 附图12页

(54)发明名称

疫苗组合物

(57)摘要

本发明涉及疫苗组合物,最特别地是其中抗原组分大(例如超过50kDa)的疫苗组合物,或是多聚体(即由亚单位组成)的疫苗组合物。这样的抗原组分特别令人感兴趣,因为它们可能代表来自目前无法针对其接种疫苗的病原体的抗原组分。本发明涉及包含展示抗原组分的粒子的组合物,其中所述组合物包含含有第一肽标签的抗原组分和含有第二肽标签的部分,其中所述抗原组分和所述部分通过所述第一和第二肽标签之间的异肽键连接,并且其中所述抗原组分超过50kDa,或者可选地是多聚体。



CN 120040601 A

1.一种组合物,所述组合物包含展示抗原组分的粒子,其中所述组合物包含:

i)包含第一肽标签的抗原组分,和

ii)包含第二肽标签的部分,

其中所述抗原组分和所述部分通过所述第一肽标签和所述第二肽标签之间的异肽键连接,并且其中所述抗原组分超过50kDa,任选地其中所述组合物是免疫原性组合物。

2.根据权利要求1所述的组合物,其中所述抗原组分为:

(i)超过60kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDa、140kDa、150kDa、160kDa、170kDa、180kDa、190kDa、200kDa、300k Da或400kDa;和/或

(ii)单体或多聚体,任选地其中所述多聚体是三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的组合物,其中所述部分是用于接种的病毒、细菌、多聚化支架、多聚化形成病毒样粒子(VLP)的蛋白组分、病毒结构蛋白、形成纳米粒子的多聚化结构域、合成的纳米粒子或合成的VLP,任选地其中所述部分是乙型肝炎病毒的表面抗原(HBsAg)。

4.根据权利要求1至权利要求3中任一项所述的组合物,其中所述第一肽标签和所述第二肽标签选自以下中的任一种:SpyTag和SpyCatcher对、SnoopTag或SnoopTagJr和SnoopCatcher对、RrgATag、RrgATag2或DogTag和RrgACatcher对、IsopepTag Pilin-C对、IsopepTag-N和Pilin-N对、PsCsTag和PsCsCatcher对、以及由SnoopLigase介导的SnoopTagJr和DogTag对或其变体、衍生物或修饰物,任选地其中所述第一肽标签和所述第二肽标签是SpyTag/SpyCatcher对。

5.根据权利要求1至权利要求4中任一项所述的组合物,其中所述抗原组分包含以下任一个的免疫原性组分:来自人类巨细胞病毒(HCMV)的五聚体复合物、来自人类巨细胞病毒(HCMV)的gB糖蛋白,来自RSV的G糖蛋白、来自RSV的F糖蛋白,来自甲型流感病毒的血凝素(HA)抗原、来自甲型流感病毒的神经氨酸酶(NA)抗原、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)Pfs230蛋白、恶性疟原虫CSP蛋白、人类HER2受体、PCSK9、VAR2CSA、恶性疟原虫RIPR蛋白、水痘带状疱疹病毒(VZV)糖蛋白E、狂犬病病毒糖蛋白或Epstein-Barr病毒(EBV)gH/gL复合物。

6.根据权利要求1所述的组合物,其中所述抗原组分包含第一肽标签,和/或其中所述部分包含第二肽标签,

所述第一肽标签:

(i)包含SEQ ID NO:27、50或56的任一项中列出的氨基酸序列;或

(ii)由SEQ ID NO:12、42、47或53的任一项中列出的核苷酸序列编码;

所述第二肽标签:

(i)包含SEQ ID NO:37中列出的氨基酸序列;或

(ii)由SEQ ID NO:22中列出的核苷酸序列编码。

7.一种疫苗,所述疫苗包含根据权利要求1至权利要求6中任一项所述的组合物,用于预防和/或治疗疾病。

8.一种产生根据权利要求1至权利要求6中任一项所述的组合物或根据权利要求7所述的疫苗的方法,所述方法包括:

-将编码第一蛋白与第一肽标签的第一遗传融合物的第一核酸引入第一宿主细胞中;

-在表达所述第一遗传融合物的条件下孵育所述第一宿主细胞;

-将编码第二蛋白与第二肽标签的第二遗传融合物的第二核酸引入第二宿主细胞中;

-在表达所述第二遗传融合物的条件下孵育所述第二宿主细胞;

-任选地纯化所表达的组分;

-在所述第一肽标签和所述第二肽标签之间形成异肽键的条件下孵育所表达的组分;并任选地纯化所得的组合物,其中所述第一蛋白包含抗原组分,并且所述第二蛋白包含部分。

9.一种核酸分子,所述核酸分子编码SEQ ID NO:27、37、50或56的任一项中列出的氨基酸序列,任选地其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:12、22、42、47或53的任一项中列出的序列。

10.一种载体,所述载体包含根据权利要求9所述的核酸分子。

11.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求9所述的核酸分子或根据权利要求10所述的载体。

12.一种试剂盒,所述试剂盒包含含有第一免疫原性组合物的组合物和任选地一种或更多种含有第二免疫原性组合物的加强组合物,其中所述第一免疫原性组合物和/或所述第二免疫原性组合物包含根据权利要求1至权利要求6中任一项所述的组合物或根据权利要求7所述的疫苗。

13.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求7所述的疫苗以及药学上可接受的缓冲剂、赋形剂、载体、佐剂或其组合。

疫苗组合物

[0001] 本申请是申请日为2019年05月03日,申请号为201980044956.2,发明名称为“疫苗组合物”的申请的分案申请。

发明背景

[0003] 疫苗是对抗和根除感染性疾病的安全且有效的方式。疫苗开发已经非常成功,但仍存在一系列疾病挑战,目前还不存在针对这些疾病挑战的疫苗,包括许多代表令人生畏的免疫障碍的重要病原体。一般认为,有效的疫苗必须运输到淋巴结,持续足够长的时间以产生免疫应答。

[0004] 疫苗开发已经从使用减毒或死亡的病原体转向使用这些病原体的较小抗原组分,目的是产生所需的保护性免疫应答,同时避免使用这种减毒毒株固有的风险。努力集中在试图表达病原体组分的免疫原性部分(诸如病原体感染细胞所需的那些组分),由于表达大抗原或多组分抗原的技术问题,为了简单起见,这些组分局限于短/小的肽和蛋白。然而,使用非常短或小的肽的一个潜在问题是抗原性可变的病原体的风险,这些病原体通过抗原特定部分的变化逃避接种疫苗诱导的免疫应答。

[0005] 大/多组分抗原的表达将带来免疫学优势,包括允许产生针对一种病原体的多个中和表位的抗体的能力。然而,可以形成复合物(以相关抗原表位得以维持并呈现以产生有效的抗体应答的方式)的一种或更多种大抗原的表达仍然是一个巨大挑战。因此,仍然存在对表达大的抗原和/或多组分抗原使得它们能够引起临床显著的免疫应答的改进的方法的需求。

[0006] 先前的重组疫苗被设计成引发针对多种抗原组分的免疫应答,其依赖于每种组分被分别表达和包装成不同的粒子,例如在抗HPV疫苗Cervarix和Gardasil的情况下,其中特定HPV毒株的重组主要衣壳L1蛋白被分别表达和组装成病毒样粒子(VLP),随后不同类型的VLP被组合成疫苗制剂。可选地,选择多个短表位并组合成单个重组疫苗(例如多聚体-001流感疫苗),但是这些表位本质上是短的线性肽,选择这些表位是为了避免涉及三维结构或重折叠的制备复杂性,并且因此不试图代表活性感染中呈现给免疫系统的天然病原体。

[0007] 例如,β-疱疹人类巨细胞病毒(HCMV,也称为人类疱疹病毒-5(HHV-5))是新生儿发育障碍的主要病毒原因。这种普遍存在的病毒已经感染了60%以上的普通人群,最初的感染通常仅为轻微或无症状的。感染后,病毒保持潜伏在体内,但可以在免疫功能低下的人(即HIV患者、移植患者和接受化疗的人)或老年人中引起严重疾病。HCMV是发达国家出生缺陷的主要感染原因。高达4/200的婴儿因先天感染而出生就带有HCMV,并且这些婴儿中高达10%将遭受长期后果。HCMV感染也与成人高血压和动脉粥样硬化有关(Cheng等人(May 2009).Früh K,ed.″Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure″.PLoS Pathog.5(5):e1000427)。因此,HCMV是公共卫生的优先级。然而,尽管进行了大量努力,迄今为止仍未开发出成功的HCMV疫苗。

[0008] 呼吸道合胞病毒(RSV)是另一种普遍存在的病毒,在受其感染的健康成人和大龄儿童中它引起极小的不适。然而,它是世界范围一岁以下婴儿的第二大死因,仅次于疟疾。

据估计,这种病毒每年在世界范围导致16万人死亡。这种病毒引起严重的呼吸道感染和并发症,包括肺炎和毛细支气管炎。高危人群包括一岁以下的婴儿和免疫功能低下的患者、老年人以及患有心肺状况的人。同样,尽管经过多年的积极研究和开发,目前仍没有获得许可的RSV疫苗。

[0009] 对于疾病,诸如由RSV和HCMV引起的那些疾病,目前没有可用的疫苗,通常目前的疫苗生产方法没有显示出期望的功效,表明在提供可选类型的疫苗以应对具有如此灾难性后果的疾病方面存在大量未满足的需求。

[0010] 最近已经描述了若干种能够自发或辅助形成酰胺键的遗传编码系统。例如,SpyTag是这样一种肽,它已被工程化,使得当与其蛋白配偶体SpyCatcher混合时,这两种组分自发且不可逆地形成异肽键。SpyTag和SpyCatcher组分在蛋白链中的位置可以设计在不同的位置,并且在宽范围的pH、缓冲剂和温度条件下具有反应性。SpyTag/SpyCatcher对及其变体和衍生物已用于疫苗开发,但迄今为止仅用于简单抗原的呈现。其他能够自发形成酰胺键的遗传编码系统包括SnoopTag/SnoopTagJr和SnoopCatcher;RrgATag/RrgATag2/DogTag和RrgACatcher、IsopepTag/IsopepTag-N和Pilin-C或Pilin-N、PsCsTag和PsCsCatcher及SnoopTagJr和DogTag(由SnoopLigase介导)以及所有这些系统的变体。

[0011] 本发明人已经展示,使用能够形成酰胺键的遗传编码系统能够在疫苗组合物中使用大/多组分抗原,这可以改善对大/多组分抗原的应答。这是令人惊讶的结果。

发明概述

[0013] 在本发明的第一方面,提供了一种组合物,该组合物包含展示蛋白组分的粒子,其中所述组合物包含:

[0014] i)包含第一肽标签的蛋白组分,和

[0015] ii)包含第二肽标签的部分,

[0016] 其中该蛋白组分和所述部分通过所述第一肽标签和所述第二肽标签之间的异肽键连接,并且其中蛋白组分超过50kDa。

[0017] 在本发明的另一方面,提供了一种组合物,该组合物包含展示蛋白组分的粒子,其中所述组合物包含:

[0018] i)包含第一肽标签的蛋白组分,和

[0019] ii)包含第二肽标签的部分,

[0020] 其中蛋白组分和所述部分通过所述第一肽标签和所述第二肽标签之间的异肽键连接,并且其中蛋白组分是多聚体。

[0021] 蛋白组分可以具有任何功能,例如它可以是酶或具有酶的特性。蛋白组分可以是全长蛋白,或者它可以是全长蛋白的一部分、区段、结构域或截短体(truncation)。蛋白组分可以是抗原或免疫原。蛋白组分也可以称为抗原组分。

[0022] 在本发明的另一方面,提供了一种组合物,该组合物包含展示抗原组分的粒子,其中所述组合物包含:

[0023] i)包含第一肽标签的抗原组分,和

[0024] ii)包含第二肽标签的部分,

[0025] 其中抗原组分和所述部分通过所述第一肽标签和所述第二肽标签之间的异肽键

连接,并且其中抗原组分超过约50kDa。

[0026] 在本发明任何方面的一些实施方案中,蛋白组分或抗原组分可以超过60kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDa、140kDa、150kDa、160kDa、170kDa、180kDa、190kDa或更大,诸如超过200kDa、超过300kDa或超过400kDa。

[0027] 多聚体可以包含任何数目的亚单位,这些亚单位在蛋白组分或抗原组分中可以共价连接或不共价连接。多聚体可以包含2个-20个亚单位,可选地3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个亚单位。可选地,多聚体可以是二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。多聚体可以来自任何合适的病原体,但优选地是病毒多聚体。

[0028] 大蛋白组分的非限制性实例,即超过50kDa或如上文描述的大蛋白组分,包括来自人类巨细胞病毒(HCMV)的五聚体复合物(PC)和gB糖蛋白,来自RSV的G糖蛋白和F糖蛋白,来自甲型流感病毒的血凝素(HA)抗原和神经氨酸酶(NA)抗原、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)Pfs230、恶性疟原虫CSP、人类HER2受体、PCSK9、VAR2CSA、恶性疟原虫RIPR、水痘带状疱疹病毒(VZV)糖蛋白E、狂犬病病毒糖蛋白和Epstein-Barr病毒(EBV)gH/gL复合物。

[0029] 在本发明任何方面的一些实施方案中,蛋白组分或抗原组分可以是单体或多聚体,例如二聚体、三聚体、四聚体或五聚体。在本发明任何方面的一些实施方案中,蛋白组分或抗原组分可以是蛋白或肽复合物。

[0030] 多聚体抗原组分的非限制性实例包括来自人类巨细胞病毒(HCMV)的五聚体复合物(PC)和gB三聚体、来自RSV的G糖蛋白和F糖蛋白、来自甲型流感病毒的血凝素(HA)抗原和神经氨酸酶(NA)抗原,其中一些在本文中有描述。其他实例包括病原诸如病毒、细菌、真菌病原体、寄生物或其他疾病载体的组分。合适的多聚体抗原组分包括,例如来源于病毒诸如流感病毒(诸如流感血凝素(HA)(例如流感三聚体))、呼吸道合胞病毒(RSV)等的多聚体抗原组分。

[0031] 蛋白组分可以通过遗传融合附接至第一肽标签,并在合适的细胞中重组表达。对于包括翻译后修饰诸如糖基化的组分,在真核或哺乳动物细胞系中表达重组蛋白可以是优选的。

[0032] 在一种实施方案中,“部分”是蛋白组分或抗原组分可以在其上展示的组分,例如使得其可用于免疫系统。在一种实施方案中,所述部分多聚化以形成所述粒子。合适地,这样的部分可以是用于疫苗接种的病毒、细菌、多聚化支架或多聚化以形成VLP(病毒样粒子)的蛋白组分。合适地,所述部分可以是噬菌体、烟草花叶病毒粒子、腺相关病毒样粒子(AAVLP)、大肠杆菌(E.coli)等的组分。在一种实施方案中,所述部分本身是病毒、细菌等的组分,使得所述部分的多聚化(例如自组装)形成用于展示蛋白组分或抗原组分的粒子。在一种实施方案中,所述部分可以是病毒结构蛋白,例如病毒包膜或衣壳蛋白或表面抗原。结构蛋白的实例包括来自流感病毒的基质M1蛋白和病毒包膜M2蛋白、来自乙型肝炎病毒的HBsAg、大肠杆菌噬菌体AP205病毒外壳蛋白(CP3)、来自多种病毒(包括腮腺炎)的血凝素-神经氨酸酶等。合适的病毒结构蛋白将是本领域技术人员已知的。在其他实施方案中,所述部分可以是蛋白或肽,诸如形成纳米粒子的多聚化结构域诸如IMX313,或在计算方面来源的粒子诸如MI3。在另外的实施方案中,所述部分可以是合成的纳米粒子或合成的VLP,诸如

金、脂肽或聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)纳米粒子。其他合适的部分可包括脂质体或外膜囊泡。合适地,包含第二肽标签的部分是第二肽标签与之附接的部分。

[0033] 使用来自病毒的结构表面抗原可以是优选的。因此,第二肽标签附接至结构表面抗原,允许形成病毒样粒子(VLP),第二肽标签附接至病毒样粒子,或者病毒样粒子上展示第二肽标签。VLP是非传染性的自组装纳米粒子,并且其重复的分子定义结构对工程化多价特别是疫苗接种具有吸引力。VLP已经从许多病毒家族的组分产生,所述病毒家族包括乙型肝炎病毒(包括乙型肝炎小表面抗原(HBsAg))、细小病毒科(Parvoviridae)(例如腺相关病毒)、逆转录病毒科(Retroviridae)(例如HIV)、黄病毒科(Flaviviridae)(例如丙型肝炎病毒)和噬菌体(例如Qβ、AP205)。这些中的任一种可以适于用作本发明中的部分。

[0034] 第二肽标签可以通过遗传融合附接至所述部分。这种遗传融合可以在序列中的任何合适的点,而不仅仅局限于末端。本领域技术人员将理解,融合蛋白可以在合适的细胞中重组表达。

[0035] 可选地,第二肽标签可以通过化学缀合的手段展示在所述部分上或附接至所述部分。这将需要例如反应性胺基团的存在,以允许缀合发生。

[0036] 相应地,在一种实施方案中,所述部分是乙型肝炎病毒的表面抗原(HBsAg)。合适地,如本文描述的,HBsAg具有SEQ ID NO:41中列出的氨基酸序列(或其功能等同物)。

[0037] 在本发明任何方面的一种实施方案中,蛋白组分或抗原组分是HCMV五聚体的免疫原性组分。合适地,抗原组分或免疫原性组分是在引入到受试者诸如患者体内时能够产生免疫应答诸如针对该组分的抗体应答的组分。相应地,例如,“HCMV五聚体的免疫原性组分”是能够在受试者中产生抗HCMV抗体应答的组分。合适地,免疫原性组分包含一种或更多种(至少一种)选自gH、gL、pUL128、pUL130和pUL131(也称为pUL131A)的HCMV五聚体亚单位组分。在一些实施方案中,免疫原性组分包含一种或更多种那些“pUL”组分或“UL”组分。在其他实施方案中,免疫原性组分包含一种或更多种那些gH组分或gL组分。在一种实施方案中,免疫原性组分包含一种或更多种“UL”组分与一种或更多种选自gH组分或gL组分的组分的组合。在本发明的另一种实施方案中,HCMV五聚体的免疫原性组分是包含所有gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131亚单位的HCMV五聚体。合适地,gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131亚单位具有对应于那些来源于任何已知HCMV毒株(包括实验室毒株和/或临床分离株)的氨基酸序列,包括Towne(GI:239909366)、AD169(GI:219879600)、Toledo(GI:290564358)和Merlin(GI:155573956)或其功能等同物。功能等同物意指共有一些同源性,并且仅在一些氨基酸上不同,但保留了能够形成提供保护性抗体的抗原性亚单位或五聚体的功能特性的氨基酸序列。组分gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A的合适变体描述于例如WO2014/005959(参见第4至10页),特此通过引用并入。有利的是,在疫苗方法中使用HCMV五聚体亚单位可以提供针对来自广泛的HCMV病毒株的感染的免疫原性保护,这是由于毒株之间在五聚体氨基酸序列水平上的高度同源性。

[0038] 在一些实施方案中,抗原组分可以对应于病原或载体的组分或其一部分。例如,为了便于制备,抗原组分可以缺乏跨膜结构域。合适地,在HCMV五聚体中,例如,HCMV五聚体的免疫原性组分包含具有截短的跨膜结构域(通过从该区域缺失一个或更多个氨基酸而被截短)的gH亚单位,使得该亚单位在宿主细胞中产生蛋白的过程中被分泌到细胞上清液中,以便于纯化。

[0039] 在一种实施方案中,gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A亚单位分别具有SEQ ID NO:28、31、35、33、36中列出的氨基酸序列(或其功能等同物)(带有或不带有所示的信号肽)。功能等同物意指共有一些同源性,并且仅在一些氨基酸上不同,但保留了功能特性例如能够形成提供保护性抗体的抗原性亚单位或五聚体的氨基酸序列。在一些实施方案中,功能等同物可以与相关氨基酸序列共有70%、80%、90%或更多的同源性。在另一种实施方案中,gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A亚单位由核酸序列诸如在SEQ ID NO:13、16、20、18、21中列出的那些核酸序列或其密码子优化的形式(带有或不带有信号肽的编码序列)编码。在一些实施方案中,gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A亚单位中的任何一个可以具有信号肽,例如存在于该毒株的天然蛋白上的信号肽、该信号肽的功能等同物、或来源于不同HCMV毒株的信号肽。在一些实施方案中,gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A亚单位中的任何一个可以具有来源于异源蛋白的信号肽。可以确定信号肽的选择,以便将表达的蛋白靶向特定的细胞(或细胞外)位置,或者赋予其他功能。在亚单位表达后,信号肽可以通过所用表达系统中的天然细胞机制或体外酶促裂解(例如,通过信号肽酶)。在一些实施方案中,gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A亚单位中的任何一个可以无信号肽地表达。在一些实施方案中,可以使用天然序列,包括内含子,其中这些序列可以导致更高的表达水平。合适地,UL128的天然核酸序列包含2个内含子。在另一种实施方案中,UL131A的核酸序列包含一个内含子。在一些实施方案中,内含子可以被去除。在一些实施方案中,天然序列可以针对相关表达系统进行密码子优化。

[0040] 在本发明任一方面的一种实施方案中,蛋白组分或抗原组分是RSV病毒的免疫原性组分,诸如附接糖蛋白(G蛋白)或融合糖蛋白(F蛋白),两者都控制感染的初始阶段。G是一种高度糖基化的90kDa II型整合膜蛋白,并且可以通过与蛋白聚糖上的硫酸乙酰肝素相互作用介导病毒附接至宿主细胞膜,并且是蛋白组分的良好候选物。

[0041] F蛋白是一种整合膜蛋白,由三种F_0单体组成,在组装过程中被加工成F_1和F_2亚单位,它们通过两个二硫键共价连接。F蛋白在A亚组和B亚组的RSV分离株中高度保守,并且氨基酸序列显示出90%或更高的同一性。F是由50千道尔顿(kDa)羧基末端F1片段和20kDa氨基末端F2片段组成的574个氨基酸的I类融合蛋白;使其成为异二聚体的三聚体。其特征在于两个弗林蛋白酶裂解位点,它们释放27个氨基酸的糖肽,并在F1氨基末端暴露疏水性融合肽。F2中有两个N-连接糖基化位点,并且F1中只有一个。去除F2和F1之间的25个氨基酸的信号肽和27个氨基酸的糖肽后,剩余的F胞外域由472个氨基酸组成。亚型A和亚型B之间在F胞外域中只有25个氨基酸不同。

[0042] 为了从RSV-F蛋白开发抗原组合物,一些研究集中在制备为三聚体的预融合蛋白的变体上。变体通过将成熟的前F的两个亚单位遗传融合成单一链而产生。已经制备了F2与F1遗传融合且融合肽和pep27区域缺失的DS-Cav1变体。F2和F1亚单位之间接头的差异表现为影响免疫原性,并且因此变体可以使用不同接头的选择。天然RSV-F蛋白序列可见于登录号P03420.1。

[0043] 预融合F蛋白的若干形式已经被研究和开发,并随后公布。这些预融合三聚体都可以适用于本发明。DS-Cav1稳定化的融合糖蛋白来源于天然蛋白。通过引用并入本文的EP2222710也公开了重组RSV抗原,该重组RSV抗原包含可溶性F蛋白多肽,该多肽包含RSV-F蛋白多肽的F2结构域和F1结构域以及三聚化结构域。在Nat.Commun.2015;6:8143,Krarup

等人中,描述了一种高度稳定的预融合RSV-F蛋白,再次通过引用并入。

[0044] WO2014/160463,通过引用并入本文,描述了以预融合构象稳定化的分离的重组RSV-F蛋白以及编码重组RSV-F蛋白的核酸分子。

[0045] WO2017/172890,通过引用并入本文,描述了取代修饰的预融合RSV-F蛋白及其编码核酸。在也通过引用并入本文的Nat Struct Mol Biol.2016Sep;23(9):811-820,Iterative structure-based improvement of a respiratory syncytial virus fusion glycoprotein vaccine,M.Gordon Joyce,Baoshan Zhang,Li Ou,Man Chen,Gwo-Yu Chuang,Aliaksandr Druz,Wing-Pui Kong,Yen-Ting Lai,Emily J.Rundlet,Yaroslav Tsybovsky,Yongping Yang,Ivelin S.Georgiev,Miklos Guttman,Christopher R.Lees,Marie Pancera,Mallika Sastry,Cinque Soto,Guillaume B.E.Stewart-Jones,Paul V.Thomas,Joseph G.Van Galen,Ulrich Baxa,Kelly K.Lee,John R.Mascola,Barney S.Graham和Peter D.Kwong中给出了进一步的描述。

[0046] 编码与T4 Fibritin三聚化结构域连接的重组F_2-F_1胞外域原聚体(protomer)的示例性核酸序列可以以下登录号获得:LP884611.1,LP884610.1,LP884609.1和LP884608.1。

[0047] 在一些实施方案中,蛋白组分或抗原组分可以对应于病原或载体的组分或其一部分。例如,为了便于制备,抗原组分可以缺乏跨膜结构域。合适地,在RSV-F蛋白或其预融合构象中,例如,F蛋白的免疫原性组分包含具有截短的跨膜结构域(通过从该区域缺失一个或更多个氨基酸而被截短)的F_2-F_1亚单位,使得该亚单位在宿主细胞中产生蛋白的过程中被分泌到细胞上清液中,以便于纯化。因此,RSV-F蛋白缺乏功能性TM结构域。可选地,与第一肽标签的遗传融合确实可以防止F蛋白驻留在膜中,尽管存在功能性跨膜结构域。

[0048] 在一种实施方案中,预融合稳定化的亚单位分别具有SEQ ID NO:50-58中列出的氨基酸序列(或其功能等同物)。功能等同物意指共有一些同源性,并且仅在一些氨基酸上不同,但保留了功能特性例如能够形成提供保护性抗体的抗原性亚单位的氨基酸序列。在一些实施方案中,功能等同物可以与相关氨基酸序列共有70%、80%、90%或更多的同源性。在一种实施方案中,预融合稳定化的RSV-F三聚体可以不包含异源三聚化结构域。

[0049] 蛋白组分包含第一肽标签。该第一肽标签可以通过表达重组融合蛋白而附接至蛋白组分。本领域技术人员将知晓用于遗传融合肽序列,以便在合适的细胞系统中表达重组蛋白的技术。对于包括翻译后修饰诸如糖基化的部分,优选的是在真核或哺乳动物细胞系中表达重组蛋白。

[0050] 有利地,使用形成异肽键的第一肽标签和第二肽标签,诸如本文描述的SpyTag-SpyCatcher系统,允许以正确的形成和方向将大抗原和/或多聚体抗原诸如HCMV五聚体或其免疫原性组分“装饰”到展示所述大抗原的部分,诸如VLP,使得抗原以能够产生抗抗原(例如抗HCMV)抗体的方式呈现给免疫系统,所述抗抗原抗体能够提供保护/中和/免疫原性作用。使用可溶性抗原(甚至是大抗原,诸如多聚体/五聚体)的传统疫苗接种方法在产生保护/中和/免疫原性作用方面可能不太有效。有利的是,在诸如VLP或纳米粒子的粒子上展示抗原(例如,多聚体抗原),导致相同抗原的几何重复阵列的呈现,相比于可溶性抗原,所述阵列能够稳健地触发免疫应答。与“游离”抗原相比,更大尺寸的VLP或其他合适的粒子还可以具有更大的免疫原性作用。此外,多聚体抗原例如HCMV五聚体的展示方向对免疫原性可能很重要。使用成对的标签,诸如本文描述的SpyTag-SpyCatcher系统,以将多聚体抗原附

接至粒子,允许抗原以特别有利的方向附接至粒子。例如,在HCMV的情况下,gH/gL亚单位与“UL”亚单位相比有中和表位的可能性较低。因此,有利的是,本发明允许通过第一肽标签的合适定位来确定HCMV五聚体在粒子上的展示方向,使得例如“UL”亚单位朝向粒子的外部展示,并且因此更容易被个体的免疫系统获得。可选地/另外地,可以确定第一肽标签在抗原上的定位,以便产生与天然病毒上相似的抗原方向,从而向免疫系统呈现以更可能诱导对入侵活病毒的免疫应答的方向展示抗原的粒子。

[0051] 相比之下,将蛋白呈现在VLP上的传统方法可以涉及化学连接,化学连接的缺点是这样的化学反应可能更随机,使得不能确定地获得正确的(例如,免疫学上优选的)抗原方向,并且可能仅代表所获得的连接反应的一小部分。此外,化学缀合所涉及的过程可能会使合适的抗原呈现所需的3-D结构不太可能得到保持。例如,在Brune等人2016;Scientific Reports,6:19234,DOI:10.1038/srep19234,Brune等人Bioconjugate Chemistry,2017,28,1544-1551,和Leneghan等人(2017)Scientific reports,7:3811中描述了传统方法的一些缺点。

[0052] 类似地,因为错误折叠和确定用于两种组分最佳表达的条件的问题,抗原与病毒外壳蛋白的遗传融合已被证明具有挑战性且耗时。此外,由于以正确的构象有效表达太难实现,因此遗传融合不适于表达大抗原或多组分抗原。

[0053] 为了以为免疫原性的方式呈现蛋白组分或抗原组分,需要仔细设计第一肽标签的位置,使得天然蛋白构象得以保持,并且如果合适,则任选地保留任何翻译后修饰。对于一些抗原,糖基化的保留不会影响表位的呈现方式,但对于其他抗原,保留或去除糖基化会提高功效。对于为跨膜蛋白的蛋白组分,蛋白组分的跨膜部分为定位第一肽标签提供了良好的目标,因为例如,该序列不涉及为抗原性的蛋白组分的构象,并且提供的作用在疫苗中不再需要。如果蛋白组分不包含跨膜蛋白,将第一肽标签融合到该组分或其亚单位(在多聚体的情况下)的C-末端或N-末端可以证明是有益的,但是第一肽标签也可以被包含在序列的任何部分中。可选地,可以将第一肽标签定位在蛋白组分或抗原组分上的环中。

[0054] 为了呈现免疫原性组分,诸如HCMV五聚体的免疫原性组分,需要仔细设计第一肽标签的位置,使得天然蛋白构象得以保持。对于HCMV,在一种实施方案中,附接是通过gH亚单位,合适地通过gH亚单位的C-末端,或gH亚单位的跨膜结构域(或其一部分)。除了保持五聚体(或五聚体的组分)的构象之外,这种合理的设计还使五聚体的靶区域如上文讨论的朝向粒子的外部呈现。如本文使用的,靶区域是已知引起具有中和作用的抗体的蛋白的一部分,并且也可以被称为免疫原性部分。

[0055] 为了呈现免疫原性组分,诸如RSV预融合F蛋白的免疫原性组分,需要仔细设计第一肽标签的位置,使得天然蛋白构象得以保持。对于RSV-F预融合蛋白,在一种实施方案中,合适的附接是通过F预融合蛋白的C-末端,通过编码它的核酸的3’末端。除了保持预融合F蛋白(或其组分)的构象之外,这种合理的设计还使预融合F蛋白的大多数中和表位如上文讨论的朝向粒子的外部呈现。同样的考虑适用于F蛋白的任何其他变体。本发明人已经展示,在C末端包含第一肽标签是有效的,留下免疫原性蛋白组分以正确折叠。

[0056] 在一种实施方案中,第一和第二肽标签是能够形成异肽键的肽标签/结合配偶体对的一部分。该异肽键可以是自发的,即没有辅助,或者需要辅助,即来自连接酶或其他辅助物的辅助。合适地,第一和第二肽标签是SpyTag/SpyCatcher对。合适地,第一和第二肽标

签选自包含以下的列表:SpyTag/SpyCatcher、SnoopTag/SnoopTagJr和SnoopCatcher、RrgATag/RrgATag2/DogTag和RrgACatcher、IsopepTag/IsopepTag-N和Pilin-C或Pilin-N、PsCsTag和PsCsCatcher、和SnoopTagJr及DogTag(由SnoopLigase介导)以及所有这些系统的变体、衍生物和修改。

[0057] 合适地,第一肽标签是来自肽标签/结合配偶体对的肽标签,诸如SpyTag,并且第二肽标签是结合配偶体,诸如SpyCatcher。在另一种实施方案中,第一肽标签是结合配偶体,诸如SpyCatcher,并且第二肽标签是来自肽标签/结合配偶体对的肽标签组分,诸如SpyTag。合适地,第一肽标签是来自肽标签/结合配偶体对的肽标签,诸如SnoopTag,并且第二肽标签是结合配偶体,诸如SnoopCatcher。在另一种实施方案中,第一肽标签是结合配偶体,诸如SnoopCatcher,并且第二肽标签是来自肽标签/结合配偶体对的肽标签组分,诸如SnoopTag。由此可见,第一肽标签可以是“标签”或“catcher”;第二肽标签是这一对的配偶体,分别是“catcher”或“标签”。WO2011/09877、WO2016/193746、WO2018/18951和WO2018/197854中详细描述了合适的肽标签/结合配偶体对,通过引用并入本文。

[0058] 在一种实施方案中,蛋白组分或抗原组分附接至作为第一肽标签的SpyTag、SnoopTag、RrgATag、RrgATag2、DogTag、IsopepTag、IsopepTag-N、PsCsTag和SnoopTagJr中的任何一种。

[0059] 如果需要,第一肽标签可以通过接头附接,接头可以是刚性的或柔性的。本领域技术人员将认识到哪种接头是合适的。

[0060] 在另一种实施方案中,所述部分附接于作为第二肽标签的SpyCatcher、SnoopCatcher、RrgACatcher、Pilin-C、Pilin-N、PsCsCatcher和DogTag(由SnoopLigase介导)中的任何一种。

[0061] 如先前讨论的,所述部分可以是任何合适的部分,包括合成的多聚化平台。

[0062] 第二肽标签可以附接至不影响所述部分折叠和形成合适构象的能力的所述部分的任何合适的位置。遗传融合可以是优选的。可以优选在所述部分的C-末端或N-末端包含第二肽标签,但是第二肽标签也可以被包含在序列的任何部分中。可选地,可以将第二肽标签定位在所述部分上的环中。例如,将SpyCatcher与RNA噬菌体AP205的病毒外壳蛋白(CP3)的N-末端遗传融合,描述于Brune等人,Scientific Reports volume 6,Article number:19234(2016)中。使用自组装合成蛋白作为多聚化平台的替代融合在Bruun等人,ACS Nano,2018,12(9),pp 8855-8866中讨论。可选地,第二肽标签可以通过化学缀合来附接。

[0063] 如果需要,第二肽标签可以通过接头来附接,接头可以是刚性的或柔性的。本领域技术人员将认识到哪种接头是合适的。

[0064] 在一种实施方案中,抗原组分,诸如HCMV五聚体或其免疫原性组分,被附接至SpyTag。一种合适的SpyTag具有SEQ ID NO:30中列出的氨基酸序列。

[0065] SpyTag可以通过接头来附接。合适的接头包括具有SEQ ID NO:29中列出的氨基酸序列的接头。

[0066] 在另一种实施方案中,所述部分被附接至SpyCatcher结合配偶体(第二肽标签)。所述部分可以合适地是HBsAg。一种合适的SpyCatcher具有SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。在一种实施方案中,SpyCatcher通过接头来附接。接头可以是刚性接头或柔性接头,合适地其中接头具有SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列。

[0067] 在另一种实施方案中,根据本发明任何方面或实施方案的蛋白组合物或抗原组合物还包含另一种(优选地不同的)蛋白,该蛋白包含第一肽标签。

[0068] 在另一种实施方案中,根据本发明任何方面或实施方案的组合物还包含另一种(优选地不同的)包含第一肽标签的抗原,诸如另一种HCMV抗原。合适地,另一种HCMV抗原是糖蛋白B。合适地,糖蛋白B序列描述于例如WO2014/005959中,参见SEQ ID NO:21、22、23或36。在一种实施方案中,组合物包含展示HCMV五聚体和另一种HCMV抗原两者的粒子(例如VLP)。

[0069] 在一种实施方案中,组合物是免疫原性组合物或疫苗组合物。优选地,所述免疫原性组合物或疫苗组合物是施用至个体后能够诱导免疫应答诸如抗体应答的组合物。合适地,免疫应答可以是保护性免疫应答。合适的免疫原性组合物可还包含另外的组分,包括佐剂、免疫刺激剂和/或药学上可接受的赋形剂。

[0070] 例如,合适的佐剂可以基于铝、肽、角鲨烯、脂质体、水包油乳液和皂苷,并且可以包括Alhydrogel®、MF59、AS01、MatrixM、胞壁酰二肽和Quil A。油包水佐剂也是合适的。角鲨烯水包油乳液,诸如Addavax™,是合适的。

[0071] 相应地,在本发明的另一方面或实施方案中,提供了包含根据本发明的组合物的免疫原性组合物或疫苗组合物。合适地,疫苗组合物包含疫苗剂量,该疫苗剂量是根据本发明的组合物的量,该量提供来自感染原/载体的免疫原性,优选地针对感染原/载体的免疫保护作用,诸如针对HCMV感染的中和作用。合适地,疫苗组合物包含疫苗剂量,该疫苗剂量是根据本发明的组合物的量,该量提供针对感染原/载体的中和作用,诸如针对RSV感染的中和作用。抗体,优选地针对免疫原性组合物产生的中和抗体,可以通过本领域技术人员熟悉的方法进行检测和测量,包括例如本文描述的标准化ELISA测定或微中和测定。

[0072] 在另一方面,提供了包含以下的VLP:

[0073] i)包含第一肽标签的部分

[0074] ii)包含第二肽标签的蛋白

[0075] 其中所述第一肽标签和所述第二肽标签形成异肽键。在一些实施方案中,所述部分是HBsAg。然而,如先前描述的,可以使用任何合适的部分。

[0076] 合适地,第一肽标签是来自肽标签/结合配偶体对的肽标签,诸如SpyTag,并且第二肽标签是结合配偶体,诸如SpyCatcher。在另一种实施方案中,第一肽标签是结合配偶体,诸如SpyCatcher,并且第二肽标签是来自肽标签/结合配偶体对的肽标签,诸如SpyTag。其他合适的肽标签/结合配偶体对在本文中描述,并且对本领域技术人员来说将是已知的。合适地,第一和第二肽标签选自包含以下的列表:SpyTag/SpyCatcher、SnoopTag/SnoopTagJr和SnoopCatcher、RrgATag/RrgATag2/DogTag和RrgACatcher、IsopepTag/IsopepTag-N和Pilin-C或Pilin-N、PsCsTag和PsCsCatcher、和SnoopTagJr及DogTag(由SnoopLigase介导)以及所有这些系统的变体、衍生物和修改。

[0077] 合适地,包含第二肽标签的蛋白是大于50kDa的蛋白或肽复合物。包含第二肽标签的蛋白可以是大于50kDa、60kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDa、140kDa、150kDa或160kDa、170kDa、180kDa、190kDa或更大,诸如超过200kDa、超过300kDa或超过400kDa的蛋白或肽复合物。

[0078] 在一种实施方案中,包含第二肽标签的蛋白是多聚体蛋白。在一种实施方案中,包

含第二肽标签的蛋白是抗原,优选地多聚体抗原。合适地,多聚体抗原可以是如本文描述的HCMV五聚体。合适地,蛋白可以是RSV-F蛋白或其衍生物(诸如预融合F蛋白)。在一种实施方案中,包含第二肽标签的蛋白是HCMV五聚体的免疫原性组分。如本文描述且包含合适的接头和标签的HCMV五聚体(gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131)具有超过160kDa的分子量。其他合适的大蛋白或抗原或者多聚体蛋白或抗原包括来自其他感染原(包括病毒诸如流感病毒、RSV等)的抗原。

[0079] 有利的是,以这种方式使用HBsAg作为载体(VLP)也可能产生抗HepB的加强,或者被描述为抗乙型肝炎病毒(HBV)应答。

[0080] 在另一方面,提供了包含以下的VLP:

[0081] i)包含第一肽标签的蛋白

[0082] ii)包含第二肽标签的部分

[0083] 其中所述第一肽标签和所述第二肽标签形成异肽键。在一些实施方案中,所述部分是HBsAg。然而,如先前描述的,可以使用任何合适的部分。

[0084] 合适地,第一肽标签是来自肽标签/结合配偶体对的肽标签,诸如SpyTag,并且第二肽标签是结合配偶体,诸如SpyCatcher。在另一种实施方案中,第一肽标签是结合配偶体,诸如SpyCatcher,并且第二肽标签是来自肽标签/结合配偶体对的肽标签,诸如SpyTag。其他合适的肽标签/结合配偶体对在本文中描述,并且对本领域技术人员来说将是已知的。合适地,第一和第二肽标签选自包含以下的列表:SpyTag/SpyCatcher、SnoopTag/SnoopTagJr和SnoopCatcher、RrgATag/RrgATag2/DogTag和RrgACatcher、IsopepTag/IsopepTag-N和Pilin-C或Pilin-N、PsCsTag和PsCsCatcher、和SnoopTagJr及DogTag(由SnoopLigase介导)以及所有这些系统的变体、衍生物和修饰。

[0085] 合适地,包含第一肽标签的蛋白是大于50kDa的蛋白或肽复合物。包含第一肽标签的蛋白可以是大于50kDa、60kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDa、140kDa、150kDa或160kDa或更大,特别是200kDa、300kDa或甚至400kDa或更大的蛋白或肽复合物。在一种实施方案中,包含第一肽标签的蛋白是多聚体蛋白。在一种实施方案中,包含第二肽标签的蛋白是抗原,优选地多聚体抗原。合适地,多聚体抗原可以是如本文描述的HCMV五聚体。合适地,蛋白可以是RSV-F蛋白或其衍生物(诸如预融合F蛋白)。在一种实施方案中,包含第一肽标签的蛋白是HCMV五聚体的免疫原性组分。如本文描述且包含合适的接头和标签的HCMV五聚体(gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A)具有超过160kDa的分子量。其他合适的大蛋白或抗原或者多聚体蛋白或抗原包括来自其他感染原(包括病毒诸如流感病毒、RSV等)的抗原。

[0086] 有利的是,以这种方式使用HBsAg作为载体(VLP)也可能产生抗HBV的加强。

[0087] 在本发明的另一方面,提供了连接至如本文描述的SpyTag的HCMV五聚体。

[0088] 根据本发明的另一方面,提供了一种产生根据本发明的组合物或VLP的方法,所述方法包括:

[0089] -将编码第一蛋白与第一肽标签的第一遗传融合物的第一核酸引入第一宿主细胞中;

[0090] -在表达所述第一遗传融合物的条件下孵育所述第一宿主细胞;任选地纯化所表达的组分;

[0091] -将编码第二蛋白与第二肽标签的第二遗传融合物的第二核酸引入第二宿主细胞中;

[0092] -在表达所述第二遗传融合物的条件下孵育所述第二宿主细胞;任选地纯化所表达的组分;

[0093] -在第一肽标签和第二肽标签之间形成异肽键的条件下孵育所表达的组分;任选地纯化所得的组合物。

[0094] 合适地,将所表达的组分一起孵育,以便形成异肽键。异肽键的形成可能需要与连接酶或类似物共孵育。

[0095] 合适地,产生根据本发明的组合物或VLP的方法可以用于产生包含展示在VLP上的抗原组分的组合物。

[0096] 在一些实施方案中,当"HCMV五聚体的免疫原性组分"包含整个HCMV五聚体时,HCMV五聚体组分的重组产生需要每个亚单位以正确的化学计量表达以形成五聚体,并正确折叠以进行组装。在这些实施方案中,需要从最终产物排除仅所需五聚体的部分的复合物(例如gH/gL二聚体和四聚体,或缺少五个亚单位中任何一个的四聚体)。有利的是,本发明通过提供一种分别制备组分并且然后将它们缀合的简单方法,克服了以其他方式在一个系统中表达所有疫苗组分(即HBsAg和HCMV五聚体的5个亚单位)可能相关的问题。相应地,在一种实施方案中,纯化标签被掺入到UL130(Hofmann等人,DOI 10.1002/bit 25670)。类似的原理也将适用于其他免疫原性组分。

[0097] 在一些实施方案中,当"RSV-F蛋白的免疫原性组分"包含整个F蛋白或其衍生物时,F蛋白或其衍生物的组分的重组产生需要其正确折叠以进行组装,其中衍生物包括预融合F蛋白三聚体。

[0098] 合适地,该方法用于产生包含展示在HBsAg VLP上的HCMV五聚体的组合物。合适地,该方法用于产生包含展示在HBsAg VLP上的RSV-F预融合F蛋白三聚体的组合物。

[0099] 在本发明的另一方面,提供了一种用于预防和/或治疗疾病的疫苗。合适地,所述疫苗包含根据本发明任何方面或实施方案的组合物或VLP。在一种实施方案中,疾病是HCMV感染。在另一方面,提供了HCMV治疗的预防性方法。合适地,疫苗用于人类。合适地,疫苗用于成年人,例如育龄女性或妊娠女性。在另一方面,本发明提供了一种在个体中诱导针对HCMV的免疫原性反应(例如保护性免疫应答)的方法,其中该方法包括施用根据本发明任何方面或实施方案的组合物。

[0100] 在本发明的另一方面,提供了根据本发明任何方面的组合物,用于用作药物。

[0101] 在本发明的另一方面,提供了根据本发明任何方面的组合物,用于用作疫苗,优选地用于预防和/或治疗HCMV感染的疫苗。根据本发明用作药物或疫苗的组合物可以施用至成年人,例如育龄女性或妊娠女性。

[0102] 在另一方面,本发明提供了用于根据本发明的方法的核酸分子。在一种实施方案中,根据本发明的核酸分子包括编码SEQ ID NO:27至41中任一项中列出的氨基酸序列的核酸序列。在一种实施方案中,根据本发明的核酸分子包括SEQ ID NO:12至26或42至46中任一项中列出的核酸序列。

[0103] 在另一方面,本发明提供了多种核酸分子,包括编码SEQ ID NO:27至41中列出的氨基酸序列的那些核酸分子。在一种实施方案中,本发明的核酸分子包括具有SEQ ID NO:

12至26或42至46中任一项中列出的序列的那些核酸分子。

[0104] 在另一方面,本发明提供了用于根据本发明的方法的核酸分子。在一种实施方案中,根据本发明的核酸分子包括编码SEQ ID NO:50至58中任一项中列出的氨基酸序列的核酸序列。在一种实施方案中,根据本发明的核酸分子包括SEQ ID NO:47至55中任一项中列出的核酸序列。

[0105] 在另一方面,本发明提供了多种核酸分子,包括编码SEQ ID NO:50至58中列出的氨基酸序列的那些核酸分子。在一种实施方案中,根据本发明的核酸分子包括具有SEQ ID NO:47至55中任一项中列出的序列的那些核酸分子。

[0106] 在另一方面,本发明提供了包含根据本发明的核酸分子或多种核酸分子的载体。合适的载体是用于表达根据本发明的组合物的任何组分的氨基酸序列的表达载体。

[0107] 在另一方面,本发明提供了用于表达根据本发明的组合物的组分的宿主细胞。合适的宿主细胞可以是用于瞬时或稳定表达这些组分的那些宿主细胞。用于表达CMV蛋白的方法和宿主细胞描述于例如WO2014/005959和WO2016/067239中,两者均通过引用并入。在一些实施方案中,组分可被糖基化。

[0108] 在本发明的另一方面,提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含根据本发明的组合物,用于初免-加强接种方案。合适地,所述试剂盒可以包含含有根据本发明的第一免疫原性组合物的初免组合物和含有根据本发明的第二免疫原性组合物的加强组合物。可选地,可以提供试剂盒以提供单剂量或多剂量接种方案,即1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个剂量。相应地,在另一方面,本发明提供了一种剂量方案,该剂量方案包括以约3周的间隔施用的剂量。

[0109] 本发明还提供了以下项目:

[0110] 1.一种组合物,所述组合物包含展示抗原组分的粒子,其中所述组合物包含:

[0111] i)包含第一肽标签的抗原组分,和

[0112] ii)包含第二肽标签的部分,

[0113] 其中所述抗原组分和所述部分通过所述第一肽标签和所述第二肽标签之间的异肽键连接,并且其中所述抗原组分超过50kDa。

[0114] 2.根据项目1所述的组合物,其中所述抗原组分超过60kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDa、140kDa、150kDa、160kDa、170kDa、180kDa、190kDa、200kDa、300k Da或400kDa。

[0115] 3.根据项目1或项目2所述的组合物,其中所述抗原组分是单体或多聚体,任选地其中所述多聚体是三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。

[0116] 4.根据任一前述项目所述的组合物,其中所述部分是用于接种的病毒、细菌、多聚化支架、多聚化形成病毒样粒子(VLP)的蛋白组分、病毒结构蛋白、形成纳米粒子的多聚化结构域、合成的纳米粒子或合成的VLP。

[0117] 5.根据任一前述项目所述的组合物,其中所述部分是HBsAg。

[0118] 6.根据任一前述项目所述的组合物,其中所述第一肽标签和所述第二肽标签选自以下中的任一种:SpyTag和SpyCatcher对、SnoopTag或SnoopTagJr和SnoopCatcher对、RrgATag、RrgATag2或DogTag和RrgACatcher对、IsopepTag Pilin-C对、IsopepTag-N和Pilin-N对、PsCsTag和PsCsCatcher对、以及由SnoopLigase介导的SnoopTagJr和DogTag对

或其变体、衍生物或修饰物,任选地其中所述第一肽标签和所述第二肽标签是SpyTag/SpyCatcher对。

[0119] 7.根据任一前述项目所述的组合物,其中所述抗原组分包含HCMV五聚体的免疫原性组分。

[0120] 8.根据项目7所述的组合物,其中所述HCMV五聚体的免疫原性组分包含gH、gL、pUL128、pUL130或pUL131亚单位中的一个或更多个。

[0121] 9.根据项目8所述的组合物,其中所述HCMV五聚体的免疫原性组分包含gH、gL、pUL128、pUL130和pUL131亚单位的全部。

[0122] 10.根据项目7至项目9中任一项所述的组合物,其中所述HCMV五聚体的免疫原性组分包含具有截短的跨膜结构域的gH亚单位。

[0123] 11.根据项目8至项目10中任一项所述的组合物,其中所述gH、gL、pUL128、pUL130和pUL131亚单位分别具有SEQ ID NO:28、31、35、33和36中列出的氨基酸序列,或其功能等同物。

[0124] 12.根据项目8至项目11中任一项所述的组合物,其中所述第一肽标签附接至所述gH亚单位,优选地附接至所述gH亚单位的C-末端。

[0125] 13.根据项目1至项目6中任一项所述的组合物,其中所述抗原组分包含RSV-F蛋白的免疫原性组分。

[0126] 14.根据项目13所述的组合物,其中所述RSV-F蛋白的免疫原性组分是预融合F蛋白,任选地是稳定化的预融合F蛋白。

[0127] 15.根据项目14所述的组合物,其中所述RSV预融合F蛋白的免疫原性组分包含F_1亚单位和F_2亚单位的三聚体。

[0128] 16.根据项目13至15中任一项所述的组合物,其中所述RSV-F蛋白具有SEQ ID NO:50至58的任一项中列出的序列。

[0129] 17.根据项目13至16所述的组合物,其中所述第一肽标签附接至所述预融合F蛋白的C末端。

[0130] 18.根据任一前述项目所述的组合物,其中所述第一肽标签是SpyTag。

[0131] 19.根据项目18所述的组合物,其中SpyTag具有SEQ ID NO:30中列出的氨基酸序列。

[0132] 20.根据项目18或项目19所述的组合物,其中SpyTag通过接头附接。

[0133] 21.根据项目20所述的组合物,其中所述接头具有SEQ ID NO:29中列出的氨基酸序列。

[0134] 22.根据任一前述项目所述的组合物,其中所述部分是HBsAg,并且任选地其中所述第二肽标签是SpyCatcher。

[0135] 23.根据项目22所述的组合物,其中所述第二肽是SpyCatcher,所述SpyCatcher具有SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。

[0136] 24.根据项目22或项目23所述的组合物,其中所述部分通过接头,优选地柔性接头,附接至所述SpyCatcher。

[0137] 25.根据项目24所述的组合物,其中所述接头具有SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列。

[0138] 26.根据任一前述项目所述的组合物,其中所述组合物是免疫原性组合物或疫苗组合物。

[0139] 27.一种疫苗,所述疫苗包含根据项目1至26中任一项所述的组合物,用于预防和/或治疗疾病。

[0140] 28.一种产生根据项目1至26中任一项的组合物的方法,所述方法包括:

[0141] -将编码第一蛋白与第一肽标签的第一遗传融合物的第一核酸引入第一宿主细胞中;

[0142] -在表达所述第一遗传融合物的条件下孵育所述第一宿主细胞;

[0143] -将编码第二蛋白与第二肽标签的第二遗传融合物的第二核酸引入第二宿主细胞中;

[0144] -在表达所述第二遗传融合物的条件下孵育所述第二宿主细胞;

[0145] -任选地纯化所表达的组分;

[0146] -在所述第一肽标签和所述第二肽标签之间形成异肽键的条件下孵育所表达的组分;并任选地纯化所得的组合物。

[0147] 29.根据项目28所述的方法,其中所述第一蛋白包含抗原组分,并且所述第二蛋白包含部分。

[0148] 30.一种核酸分子,所述核酸分子用于根据项目28或项目29所述的方法,其中所述核酸分子编码SEQ ID NO:27至41中任一项中列出的氨基酸序列。

[0149] 31.根据项目30所述的核酸分子,所述核酸分子具有SEQ ID NO:12至26或42至46中任一项中列出的核苷酸序列。

[0150] 32.一种核酸分子,所述核酸分子用于根据项目28或项目29所述的方法,其中所述核酸分子编码SEQ ID NO:50至58中任一项中列出的氨基酸序列。

[0151] 33.根据项目32所述的核酸分子,所述核酸分子具有SEQ ID NO:47至55中任一项中列出的核苷酸序列。

[0152] 34.一种载体,所述载体包含根据项目30至33中任一项所述的核酸分子。

[0153] 35.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据项目30至32中任一项所述的核酸分子或根据项目34所述的载体。

[0154] 36.一种试剂盒,所述试剂盒包含含有第一免疫原性组合物的组合物和任选地一种或更多种含有第二免疫原性组合物的加强组合物,其中所述第一免疫原性组合物和/或所述第二免疫原性组合物包含根据项目1至项目26中任一项所述的组合物。

[0155] 37.一种疫苗,所述疫苗用于预防和/或治疗HCMV感染,所述疫苗包含根据项目7至12中任一项所述的组合物。

[0156] 38.一种疫苗,所述疫苗用于预防和/或治疗RSV感染,所述疫苗包含根据项目13至17中任一项所述的组合物。

附图说明

[0158] 图1.在非还原条件和还原条件下对纯化的五聚体-SpyTag的SDS-PAGE和蛋白印迹分析。泳道1:ColorPlus预染宽范围蛋白梯状物,大小以kDa表示;泳道2:非还原样品;泳道3:还原样品。A)SDS-PAGE和考马斯染色分析,指示了HCMV五聚体组分的位置,凝胶的左侧为

非还原的,而凝胶的右侧为还原的。B)使用抗HCMV五聚体抗体的蛋白印迹分析。

[0159] 图2.在非还原条件(NR)和还原条件(R)下对纯化的SpyCatcher-HBsAg的SDS-PAGE和蛋白印迹分析。A)SDS-PAGE和考马斯染色分析。B)使用抗HBsAg单克隆抗体的蛋白印迹分析。

[0160] 图3:使用s200increase 3.2/300柱的HPLC分析。A)加载10μl纯化的HCMV五聚体-SpyTag,并作为单一峰洗脱。B)加载10μl纯化的SpyCatcher-HBsAg,并以柱的外水体积作为单一主峰洗脱。

[0161] 图4:在还原条件下对缀合的五聚体-SpyTag和SpyCatcher-HBsAg的SDS-PAGE和蛋白印迹分析。1:ColorPlus预染宽范围蛋白梯状物,大小以kDa表示;2:缀合物;3:五聚体-SpyTag;4:SpyCatcher-HBsAg。A)SDS-PAGE和考马斯染色分析。B)使用抗HBsAg单克隆抗体的蛋白印迹。C)使用抗五聚体多克隆抗体的蛋白印迹。

[0162] 图5:使用s200 increase 3.2/300柱的HPLC分析。加载30μl缀合的五聚体-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg,并以柱的外水体积作为主峰洗脱。

[0163] 图6:用Addavax作为佐剂,HCMV五聚体-HBsAg疫苗对比五聚体蛋白疫苗在单次免疫后的免疫原性。将BALB/c小鼠用1μg或0.1μg的作为可溶性蛋白或作为五聚体-HBsAg VLP的HCMV五聚体-SpyTag免疫。通过标准化ELISA从小鼠血清测量滴度。线代表平均值,误差线代表标准差(n=10)。与仅用HCMV五聚体蛋白免疫的小鼠相比,甚至当五聚体等效VLP剂量低10x时,用HCMV五聚体-HBsAg VLP免疫的小鼠显示出明显更强的血清IgG抗体反应。

[0164] 图7:与五聚体蛋白疫苗相比,用HCMV五聚体-HBsAg疫苗免疫的小鼠血清的中和活性。用Addavax作为疫苗的佐剂,并且示出了一次免疫后(初免后)或两次免疫后(加强后)的应答。对用$AD169^{wt131}$毒株(展示功能性五聚体)感染的ARPE-19细胞测量了NT_{50}。在同一测定中,示出了Cytogam和商购可得的中和抗gH mAb(HCMV16(51C1),来自Bio-Rad Antibodies)的中和滴度。

[0165] 图8:无佐剂,HCMV五聚体-HBsAg疫苗对比五聚体蛋白疫苗在一次或两次免疫后的免疫原性。将BALB/c小鼠用1μg或0.1μg的与SpyCatcher-HBsAg缀合的HCMV五聚体-SpyTag(五聚体-HBsAg)或用1μg的五聚体-SpyTag蛋白免疫。通过标准化ELISA从小鼠血清测量滴度。线代表平均值,误差线代表标准差(n=10)。与仅用HCMV五聚体蛋白免疫的小鼠相比,甚至当五聚体等效VLP剂量低10x时,用HCMV五聚体-HBsAg VLP免疫的小鼠显示出明显更强的血清IgG抗体反应。

[0166] 图9:与五聚体蛋白疫苗相比,用HCMV五聚体-HBsAg疫苗免疫的小鼠血清的中和活性。疫苗无佐剂,并且示出了一次免疫后(初免后)或两次免疫后(加强后)的应答。对用$AD169^{wt131}$毒株(展示功能性五聚体)感染的ARPE-19细胞测量了NT50。在同一测定中,示出了Cytogam和商购可得的中和抗gH mAb(HCMV16(51C1),来自Bio-Rad Antibodies)的中和滴度。

[0167] 图10.在非还原条件和还原条件下对纯化的RSV-F-SpyTag的SDS-PAGE和蛋白印迹分析。A)SDS-PAGE和考马斯染色分析,泳道1:ColorPlus预染宽范围蛋白梯状物;泳道2:非还原样品;泳道3:还原样品。B)使用抗RSV-F单克隆抗体的蛋白印迹分析,泳道1:ColorPlus预染宽范围蛋白梯状物;泳道2:非还原样品;泳道3:还原样品。

[0168] 图11.在还原条件下对与SpyCatcher-HBsAg缀合的RSV-F-SpyTag的SDS-PAGE和蛋

白印迹分析。1:ColorPlus预染宽范围蛋白梯状物,2:RSV-F-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg缀合物,3:RSV-F-SpyTag,4:SpyCatcher-HBsAg。A)SDS-PAGE和考马斯染色分析。B)使用抗HBsAg单克隆抗体的蛋白印迹。C)使用抗RSV-F单克隆抗体的蛋白印迹。

[0169] 图12.缀合的RSV-F-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg('Sc9-10-HBsAg')对比非缀合的RSV-F-SpyTag('Sc9-10')的免疫原性。在无佐剂或用Addavax™作为佐剂的情况下,用1μg的与SpyCatcher-HBsAg缀合的RSV-F-SpyTag(RSV-F VLP)或1μg的RSV-F-SpyTag蛋白免疫BALB/c小鼠(n=8)。RSV-F抗原为sc9-10 DS-Cav1 A149C Y458C-SpyTag。

发明详述

[0171] 病毒样粒子

[0172] 传统上,疫苗方法使用减毒或死亡的整个病原体,尽管这已被使用包含来自适当病原体的蛋白的重组亚单位疫苗所取代。最近,已经开发了使用病毒样粒子(VLP)的方法。VLP是其大小(约20-200nm)、其形状及其重复的蛋白排列与病毒相似,但缺乏来自病原体的任何遗传物质的粒子。由于其大小,VLP更可能流到淋巴结,使其成为抗原呈递细胞摄取和呈递的理想选择。此外,它们的重复结构有利于补体固定和B细胞受体交联(Kushnir等人Vaccine 2012;Vol 31(1):58-83)。然而,它们的作用机制不限于理论。

[0173] HCMV

[0174] 人类巨细胞病毒(HCMV,也称为人类疱疹病毒-5(HHV-5))是一种大多数成年人都暴露过的病毒,最初的感染通常仅是轻微或无症状的。感染后,病毒保持潜伏在体内,但可以在免疫功能低下的人或老年人中引起严重疾病。HCMV也是发达国家出生缺陷的主要感染原因。高达4/200的婴儿因先天感染而出生就带有HCMV,并且这些婴儿中高达10%将遭受长期后果。HCMV感染也与成人高血压和动脉粥样硬化有关(Cheng等人(May 2009).Früh K,ed."Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure".PLoS Pathog.5(5):e1000427)。

[0175] 基于对针对包含病毒蛋白gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A的HCMV的五聚体复合物的抗体可以中和病毒进入上皮细胞以及降低HCMV围产期传播风险的观察,该复合物已被鉴定为HCMV的潜在有用疫苗靶。然而,尽管进行了大量努力,迄今为止仍未开发出成功的HCMV疫苗。

[0176] HCMV五聚体

[0177] HCMV毒株,包括临床分离株和实验室毒株,其基因组序列不同。HCMV毒株包括Merlin(GI:155573956)、Towne(GI239909366)和AD169(GI:219879600)、Toledo(GI290564358)和TB40/E。HCMV含有多种膜蛋白和蛋白复合物。五聚体蛋白gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A对于HCMV感染上皮细胞和内皮细胞是重要的,这被认为是通过内吞途径进行的。该复合物的组分的其他组合已被显示对例如成纤维细胞的感染是重要的。"pUL"亚单位/组分也被称为"UL";"pUL131"也被称为"pUL131A"和"pUL131a"或"UL131A"。

[0178] 多种HCMV毒株已被保藏在ATCC,并且可以作为以下找到:Merlin(VR-1590)、Towne(VR-977)和AD169(VR-538)。基因组序列可通过以下登录号引用:Merlin(AY446894.2)、Towne(GO121041.1)、AD169(FJ527563.1)、Toledo(GU37742.2)和TB40/E(KF297339.1)。

[0179] RSV

[0180] 呼吸道合胞病毒是全世界幼儿严重呼吸道疾病的主要原因。据估计,每年有340万年龄低于5岁的儿童因严重的RSV下呼吸道感染而住院,在年龄低于6个月的儿童中具有最高的发病率。大多数死亡发生在1岁以下的婴儿和发展中国家。目前,用于预防和控制的选择有限。

[0181] RSV预融合三聚体

[0182] F糖蛋白是一种I型病毒融合蛋白。认为RSV F前体(F0)在两个位点处被弗林蛋白酶样蛋白酶裂解,这产生三个片段。较短的N-末端片段(F_2)通过两个二硫键共价地与较大的C-末端片段(F_1)共价附接。其间的27个氨基酸的片段在裂解后解离,并且不存在于成熟蛋白中。

[0183] 如先前讨论的,有许多稳定化的预融合F三聚体可用。在本文提交的实例中,编码这些预融合三聚体的示例性序列可见于SEQ ID NO:48、49、54和55。包含与SpyTag的融合的序列作为SEQ ID NO:47和53被包括。对于预融合三聚体,氨基酸序列如SEQ ID NO:51、52、57和58所示,并且对于带有SpyTag的,氨基酸序列如SEQ ID NO:50和56所示。本文提及了其他示例性序列。

[0184] 肽标签/结合配偶体对

[0185] 能够自发形成异肽键的蛋白(所谓的“异肽蛋白”)已被有利地用于开发肽标签/多肽结合配偶体对(即两部分接头),它们彼此共价结合并提供不可逆的相互作用(参见例如WO2011/098772和WO 2016/193746,两者均通过引用并入本文,以及WO2018/189517和WO2018/197854,两者均通过引用并入本文)。在这方面,能够自发形成异肽键的蛋白可以作为分开的片段表达,以给出肽标签和肽标签的多肽结合配偶体,其中这两种片段能够通过异肽键的形成共价重组,从而连接融合至肽标签与其多肽结合配偶体的分子或组分。由肽标签与其多肽结合配偶体形成的异肽键在非共价相互作用会快速解离的条件下是稳定的,例如在长时间段(例如几周)、高温(达至少95℃)、高作用力或苛刻的化学处理(例如pH 2-11、有机溶剂、去污剂或变性剂)。

[0186] 异肽键是羧基基团/甲酰胺基基团与氨基基团之间形成的酰胺键,其中至少一个羧基基团或氨基基团在蛋白主链(蛋白的骨架)之外。这样的键在典型的生物条件下是化学上不可逆的,并且它们对大多数蛋白酶有抗性。由于异肽键本质上是共价的,因此它们导致一些测量到的最强的蛋白相互作用。

[0187] 简而言之,两部分接头,即肽标签及其多肽结合配偶体(所谓的肽标签/结合配偶体对),可以来源于能够自发形成异肽键的蛋白(异肽蛋白),其中蛋白的结构域被分别表达以产生肽“标签(tag)”和肽或多肽结合配偶体(或“捕捉者(catcher)”),该肽“标签”包含参与异肽键的残基之一(例如天冬氨酸或天冬酰胺、或赖氨酸),该肽或多肽结合配偶体(或“捕捉者”)包含参与异肽键的另一个残基(例如赖氨酸、或天冬氨酸或天冬酰胺)和形成异肽键所需的至少一个其他残基(例如谷氨酸)。混合肽标签和结合配偶体导致标签和结合配偶体之间自发形成异肽键。因此,通过将肽标签和结合配偶体分别掺入不同的分子或组分例如蛋白中,有可能通过在肽标签和结合配偶体之间形成的异肽键将所述分子或组分共价连接,即在掺入肽标签和结合配偶体的分子或组分之间形成接头。

[0188] 异肽键的自发形成可以是孤立的,并且不需要添加任何其他实体。对于一些肽标签和标签配偶体对,可能需要辅助实体诸如连接酶的存在,以产生异肽键。

[0189] 称为SpyTag/SpyCatcher的肽标签/结合配偶体对(两部分接头),来源于酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)FbaB蛋白的CnaB2结构域(Zakeri等人,2012,Proc Natl Acad Sci U S A109,E690-697),并且用于包括疫苗开发的多种应用(Brune等人,2016,Scientific reports 6,19234;Thrane等人,2016,Journal of Nanobiotechnology 14,30)。

[0190] 合适地,第一和第二肽标签形成肽标签/结合对,称为SpyTag/SpyCatcher。合适地,SpyCatcher组分是DeltaN1(ΔN1)SpyCatcher(如在Li,L.,Fierer,J.O.,Rapoport,T.A.&Howarth,M.Structural analysis and optimization of the covalent association between SpyCatcher and a peptide Tag.J.Mol.Biol.426,309-317(2014)中描述的),与“SpyCatcher”相比,DeltaN1(ΔN1)SpyCatcher在N-末端有23个氨基酸的截短(SEQ ID No.38)。

[0191] 在其他实施方案中,第一和第二肽标签形成肽标签/结合对,其是展示出异肽键形成反应速率增加的SpyTag/SpyCather的突变形式,诸如例如,在共同待决申请GB1706430.4中描述的那些。在一些实施方案中,这些突变形式可以在大蛋白(例如>50kDa或>100kDa,诸如本文描述的>160kDa HCMV五聚体蛋白)的附接和/或反应慢或空间位阻可能是问题的情况下有用。

[0192] 在其他实施方案中,异肽蛋白可以包括SnoopTag/SnoopCatcher,描述于例如WO2016/193746中。

[0193] 在一些实施方案中,一种或两种异肽蛋白可以具有N-末端截短或C-末端截短,同时仍然保持异肽键的反应性。

[0194] 示例性的第一和第二肽标签对(肽标签/结合配偶体对;反应性对)在下表中描述:

[0195]

	反应性对	
(a)	SpyTag	SpyCatcher
	SpyTag002	
	SpyTag002 RG T3H	
(b)	SpyTag	SpyCatcher002
	SpyTag002	
	SpyTag002 RG T3H	
(c)	SpyTag	SpyCatcher002 D5A A92P Q100D
	SpyTag002	
	SpyTag002 RG T3H	
(d)	SnoopTag	SnoopCatcher
	SnoopTagJr	
(e)	RrgATag	RrgACatcher
	RrgATag2	
	DogTag	
(f)	Isopeptag	Pilin-C
(g)	Isopeptag-N	Pilin-N
(h)	PsCsTag	PsCsCatcher
(i)	SnoopTagJr	DogTag［由SnoopLigase介导］

[0196] 描述于例如WO2011/098772、WO2016/193746、GB1706430.4、GB 1705750.6或Li,L.,等人,J.Mol.Biol.426,309-317(2014)中。

[0197] 结合对的变体、衍生物和修饰可以通过任何合适的方式进行。变体、衍生物和功能性操作性修饰可以涉及氨基酸的添加、取代、改变或缺失,它们在与相关结合配偶体形成异

肽键的能力方面保持相同的功能。

[0198] 对于一些结合对,需要第三实体诸如酶的介导。例如,SnoopLigase可以用来介导SnoopTagJr和DogTag之间的键形成。因此,配对可能需要酶诸如连接酶的帮助。

[0199] HBsAg

[0200] “HBsAg”意指来自乙型肝炎病毒的表面抗原(HBsAg)或其一部分。在一种实施方案中,HBsAg可以指HBsAg的N-末端,诸如SEQ ID NO:41中列出的HBsAg序列,包含乙型肝炎病毒(adw血清型)的S蛋白的226个氨基酸。合适地,HBsAg包含四个氨基酸的序列Pro Val Thr Asn,代表乙型肝炎病毒(adw血清型)preS2蛋白的四个羧基末端残基,如Valenzuela等人,(1979)‘Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen’Nature 280:815-819中描述的。由HBsAg形成的VLP已被批准用于抗乙型肝炎的临床应用(Kushnir等人Vaccine2012;Vol 31(1):58-83),包括Recombivax HB(https://vaccines.procon.org/sourcefiles/recombivax_package_insert.pdf)和Energix B(https://au.gsk.com/media/217195/engerix-b_pi_006_approved.pdf)。HBsAg还被用作红细胞前期疟疾疫苗RTS,S的基础,RTS,S已完成III期临床试验,并且是迄今为止最先进的疟疾疫苗(http://www.malariavaccine.org/sites/www.malariavaccine.org/files/content/pag e/files/RTSS%20FAQs_FINAL.pdf;Kaslow and Biernaux,Vaccine 2015,Vol.33(52):7425-7432)。

[0201] 接头详细信息

[0202] 蛋白之间的距离(例如VLP和装饰抗原)会对蛋白中抗原表位的可用性、蛋白的稳定性产生影响,并且还会由于任一种异肽键配偶体(例如SpyTag/SpyCatcher)的可及性而对缀合效率产生影响。因此,可以选择具有合适特性的接头,以优化可用性、稳定性和/或可及性。接头可以广义地细分为柔性和刚性子类型。

[0203] 柔性接头

[0204] 当所连接的结构域需要移动时,可以使用柔性接头。它们通常由小的非极性(例如:Gly)或极性(例如:Ser、Thr)氨基酸组成,其中小的尺寸提供了柔性(Chen等人,2013Adv Drug Deliv Rev.Oct 15;65(10):1357-1369)。Ser或Thr的添加可以帮助维持在溶液中的稳定性,并且调整长度可以影响蛋白的正确折叠(Chen等人,2013)。可以使用具有适合相关实体的性质和长度的任何合适的柔性接头。合适地,柔性接头可以包含2个和70个之间的这种类型的氨基酸的组合。

[0205] 实例:

[0206]

序列名称	序列	SEQ ID No
柔性接头 1	GSG	n/a
柔性接头 2 - $(GSG)_2$	GSGGSG	SEQ ID NO: 1
柔性接头 3 - $(GSG)_3$	GSGGSGGSG	SEQ ID NO: 2
柔性接头 4 – $(G4S)_1$	GGGGS	SEQ ID NO: 3
柔性接头 5 - $(G4S)_3$	GGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 4
柔性接头 6 - $(G4S)_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 5
柔性接头 7	GSAGSAAGSGEF	SEQ ID NO: 6
柔性接头 8	KESGSVSSEQLAQFRSLD	SEQ ID NO: 7
柔性接头 9	EGKSSGSGSESKST	SEQ ID NO: 8

[0207] 刚性接头

[0208] 在某些情况下,刚性接头可以是优选的,因为它们可以帮助提供蛋白分离。刚性接头具有二级结构。最常见的刚性接头之一是$(EAAAK)_n$(其中n是重复的数目),它采用α-螺旋结构(Arai等人,(2001)Protein Eng.Aug;14(8):529-32)。其他刚性接头可以包括富含脯氨酸的序列诸如$(XP)_n$,其中X是任何氨基酸,但优选Ala(A)、Lys(K)或Glu(E),其中脯氨酸提供构象约束(Chen等人,2013)。

[0209] 其他合适的接头例如由Klein等人(2014)Protein Eng Des Sel.Oct;27(10):325-330描述。可以使用具有适合相关实体的性质和长度的任何合适的刚性接头。合适地,刚性接头可以包含2个和70个之间的这种类型的氨基酸的组合。

[0210] 实例:

[0211]

序列名称	序列	SEQ ID No
刚性接头1	EAAAK	SEQ ID NO:9
刚性接头2-$(EAAAK)_3$	EAAAKEAAAKEAAAK	SEQ ID NO:10
刚性接头3-$(AP)_7$	APAPAPAPAPAPAP	SEQ ID NO:11

[0212] 宿主细胞和表达载体

[0213] 本领域技术人员将了解用于表达核酸以产生根据本发明的蛋白和组合物的合适宿主细胞。

[0214] 在一种实施方案中,宿主细胞将适于瞬时表达。在另一种实施方案中,宿主细胞将是能够形成稳定细胞系的那些细胞。合适地,编码抗原组分诸如HCMV五聚体和RSV-F蛋白(包括包含形成异肽键的肽标签的那些序列)的编码序列将被整合到一个宿主细胞中。在一种实施方案中,编码多聚体诸如五聚体的亚单位的每种核酸序列将被包含在不同的质粒/载体中,使得当在合适的条件下培养时,用例如所有5种质粒/载体转染宿主细胞将导致宿主细胞产生五聚体。在其他实施方案中,质粒/载体可以包含一种或更多种编码序列的组合,使得可以引入至少1种、2种、3种、4种或5种质粒。可选地,可以在一种载体中提供完整的融合肽编码序列,使得在同一载体上编码完整的蛋白组分和第一肽标签。

[0215] 在一种实施方案中,这些载体用于将编码序列稳定整合到宿主细胞的基因组中。

用于稳定表达的合适宿主细胞包括哺乳动物细胞,诸如HEK细胞(人类胚胎肾293细胞)或啮齿动物细胞,包括CHO(中国仓鼠卵巢)细胞。用于表达根据本发明的组合物的蛋白组分的合适的哺乳动物细胞和载体将是本领域技术人员已知的,并在例如WO2016/067239第15-16页和Hofmann等人,(2015)Biotech and Bioeng,112(12):2505-2515中描述。用于表达根据本发明的组分的示例性稳定构建体序列可见于以下实施例3。

[0216] 亲和纯化

[0217] 在一些实施方案中,用于表达根据本发明的组合物的组分的那些表达构建体可以包含"标签"序列或促进纯化诸如亲和纯化的序列。可以包含任何合适的标签诸如亲和标签,以便从产生蛋白组分和第一肽标签的系统分离蛋白组分和第一肽标签。重组蛋白产生领域的技术人员知晓为了纯化目的可以包括的系统诸如His-标签和Strep-标签。这样的标签极大地有助于蛋白纯化,并且很少对生物活性或生化活性产生不利影响,而因此是理想的。合适的标签序列包括C标签、组氨酸标签(His-标签)、链霉亲和素标签(Strep-标签)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和FLAG标签。

[0218] 蛋白组分和/或所述部分两者均可以包含亲和纯化标签。为了便于使用,这些通常被遗传融合在蛋白的C-末端或N-末端。

[0219] 因此,在一些实施方案中,例如,HCMV、RSV预融合F蛋白或HBsAg肽/蛋白的gH、gL、pUL128、pUL130、pUL131A(或其片段)亚单位可在N-末端或C-末端包含另外的氨基酸残基,这有利于纯化。这样的另外的氨基酸残基可以包括标签,诸如例如His-标签或C标签。在一些实施方案中,C标签可以提供更清洁的纯化。其他合适的标签序列包括麦芽糖结合蛋白(MBP)、Strep-标签、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和FLAG标签。在一些实施方案中,标签可以以这样的方式连接至氨基酸序列,即标签可以在纯化后通过例如使用例如可裂解的接头被裂解。在其他实施方案中,可以使用非亲和纯化方法。

[0220] 在其他实施方案中,RSV预融合F蛋白可以在C-末端或N-末端包含另外的氨基酸残基,这有助于纯化。本文举例说明,RSV预融合F蛋白具有用于亲和纯化的C标签。

[0221] 第一和第二肽标签对的缀合

[0222] 第一和第二肽标签/结合配偶体/反应性对的缀合可以在4℃过夜进行。可选地,缀合反应可以在室温进行3-4小时,因为预计在室温偶\联速度会增加。对于特定的偶联反应,最佳的第一和第二结合配偶体比率取决于每种结合配偶体的大小。例如,对于较小的抗原(~20kDa),VLP单体与抗原的摩尔比为1:1.5可以是足够的,而对于较大的抗原(>100kDa),与相同的VLP单体组合,1:1的质量比可以是足够的。然而,这两种比率都会导致过量的抗原(较小的结合配偶体)。任何过量的抗原可以通过例如尺寸排阻色谱法(SEC)或通过透析来去除。透析可能更适用于较小的抗原,因为它不如SEC有效。可选地,可以优化VLP/粒子与抗原的比率,使得所有的抗原被缀合,并且因此不需要下游纯化。约1mg/ml的合适的最终蛋白浓度对于缀合反应是最佳的,因为较低的浓度会降低反应速度。接近中性pH的许多种缓冲液与偶联/缀合相容。缀合缓冲液的标准选择是TBS(20mM Tris和150mM NaCl,pH 7.4)。在某些情况下,如Brune等人Sci Rep.(2016)描述的,可以使用添加柠檬酸盐缓冲液的10x储备液(40mM Na_2HPO_4、200mM柠檬酸钠,pH 6.2)。

[0223] 药物组合物和用途

[0224] 本发明的组合物可以掺入疫苗或免疫原性组合物中。合适地,疫苗或免疫原性组

合物将包含免疫原性剂量的本发明的粒子。

[0225] 药物组合物可以包含与药学上可接受的载体一起提供的根据本发明的粒子或免疫原性组合物。合适的载体是本领域普通技术人员所熟知的。在一种实施方案中,药物组合物包含缓冲剂、赋形剂或载体。合适地,药物组合物可以包含合适的赋形剂和制剂,以保持组合物的稳定性。合适地,制剂可以包含佐剂。在一种实施方案中,制剂可以包含配方类似于MF59®的AddaVax™或类似的基于角鲨烯的水包油纳米乳液。其他合适的佐剂包括基于脂质体的佐剂,诸如基质M(Matrix M)和AS01。其他合适的佐剂包括铝基制剂,诸如Alhydrogel®。在一种实施方案中,制剂可以包含EDTA,例如5mM浓度的EDTA。合适的赋形剂或制剂可以取决于粒子或免疫原性组合物的特性;例如,表达系统的选择可能影响组合物中蛋白的稳定性、糖基化或折叠,这可能继而影响组合物的最佳制剂。确定合适的赋形剂、制剂或佐剂的方法将是本领域技术人员已知的。

[0226] 鉴于本公开内容,本发明的各种其他方面和实施方案对于本领域技术人员而言将是明显的。

[0227] 本说明书中提及的所有文件均通过引用以其整体并入本文。

[0228] 在本文中使用的"和/或"应被认为是两个指定的特征或组分中的每一个与或不与另一个的具体公开。例如"A和/或B"应被认为是(i)A、(ii)B和(iii)A和B中的每一个的具体公开,如同每一个在本文中单独列出一样。

[0229] 除非上下文另有指示,否则上文列出的特征的描述和定义不限于本发明的任何特定方面或实施方案,并且等同地适用于所描述的所有方面和实施方案。

[0230] 本领域技术人员还将理解,尽管已经参照若干实施方案通过实例的方式描述了本发明。它不限于所公开的实施方案,并且在不脱离如所附权利要求书中定义的本发明的范围的情况下,可以构建替代实施方案。

[0231] 本文中用于描述多核苷酸的"重组"意指基因组、cDNA、半合成或合成来源的多核苷酸,由于其来源或操作:(1)与自然界中与其相关的多核苷酸的全部或部分不相关;和/或(2)连接至不同于自然界中与其连接的多核苷酸。用于蛋白或多肽方面的术语"重组"意指通过表达重组多核苷酸产生的多肽。

[0232] 除非特别说明,否则包括步骤的过程可以以任何合适的顺序执行。因此,这些步骤可以以任何适当的顺序执行。

[0233] 多肽序列之间的序列同一性优选地通过成对比对算法来确定,所述成对比对算法使用Needleman-Wunsch全局比对算法(Needleman和Wunsch1970),使用默认参数(例如,使用EBLOSUM62评分矩阵,空位开放罚分=10.0,并且空位延伸罚分=0.5)。该算法在EMBOSS软件包中的needle工具中方便地实现(Rice,Longden和Bleasby 2000)。应在本发明多肽序列的整个长度上计算序列同一性。

[0234] 本文提及的组分的任何同源物通常是功能性同源物,并且通常与蛋白的相关区域至少40%同源。同源性可以用已知的方法来测量。例如,UWGCG软件包提供了可以用于计算同源性的BESTFIT程序(例如,以其默认设置使用)(Devereux等人(1984)Nucleic Acids Research 12,387-395)。PILEUP算法和BLAST算法可用于计算同源性或排列序列(line up sequences)(通常基于它们的默认设置),例如在Altschul S.F.(1993)J Mol Evol 36:290-300;Altschul,S,F等人(1990)J Mol Biol 215:403-10中描述的。用于进行BLAST分析

的软件为通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)公共可得的。

[0235] BLAST算法对两个序列之间的相似性进行统计分析;参见例如,Karlin和Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:5873-5787。由BLAST算法提供的相似性的一个测量值是最小总概率(P(N)),所述最小总概率提供两个核苷酸序列或氨基酸序列之间的匹配偶然发生的概率的指示。例如,如果在第一序列与第二序列的比较中最小总概率小于约1、优选地小于约0.1、更优选地小于约0.01、并且最优选地小于约0.001,则认为序列与另一序列相似。

[0236] 变体多肽包含与天然蛋白具有至少40%同一性的序列(或由其组成)。在优选的实施方案中,变体序列可以在至少20个、优选地至少30个、例如至少40个、60个、100个、200个、300个、400个或更多个连续氨基酸上,或者甚至在变体的整个序列上,与天然蛋白的特定区域至少55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%和更优选地至少95%、97%或99%同源。可选地,变体序列可以与全长天然蛋白至少55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%和更优选地至少95%、97%或99%同源。通常,变体序列与天然蛋白的相关区域的差异为至少于2个、5个、10个、20个、40个、50个或60个突变或少于2个、5个、10个、20个、40个、50个或60个突变(每个突变可以是取代、插入或缺失)。本发明的变体序列可以与全长天然蛋白的特定区域具有某一同一性百分比,该同一性百分比与跨上文提及的序列的任何长度的特定同源值百分比的任一种相同(即,它可以具有至少40%、55%、80%或90%和更优选地至少95%、97%或99%同一性)。

[0237] 蛋白的变体也包括截短体。可以使用任何截短体,条件是变体仍然有功能。通常进行截短以去除对活性/功能,特别是异肽键的形成,和/或不影响折叠蛋白的构象,特别是任何免疫原性位点的折叠非必需的序列。也可以选择截短体以提高组分产生的简易性。合适的截短体通常可以通过从N-末端或C-末端系统地截短不同长度的序列来鉴定。

[0238] 天然蛋白的变体还包括突变体,突变体具有一个或更多个,例如,2个、3个、4个、5个至10个、10个至20个、20个至40个或更多个相对于天然蛋白的特定区域的氨基酸插入、取代或缺失。缺失和插入优选在抗原区域之外进行。插入通常在来源于天然蛋白的序列的N-末端或C-末端进行,例如为了重组表达的目的。取代通常也在对活性/功能非必需和/或不影响折叠蛋白构象的区域中进行。可以进行这种取代以改进蛋白的溶解性或其他特征。为了增加蛋白的稳定性,可以进行取代。

[0239] 取代优选地引入一个或更多个保守改变,保守改变用化学结构相似、化学性质相似或侧链体积相似的其他氨基酸取代氨基酸。所引入的氨基酸可以与它们所替代的氨基酸具有相似的极性、亲水性、疏水性、碱性、酸性、中性或电荷。可选地,保守改变可以引入另一种芳香族或脂肪族氨基酸来替代预先存在的芳香族或脂肪族氨基酸。保守氨基酸改变是本领域熟知的。

[0240] 衍生物是通过替换母体实体的一些部分而从母体实体产生或制备的实体。

实施例

[0241] 实施例1

[0242] 示例性多聚体——VLP组合物(HCMV五聚体-HBsAg VLP)的产生

[0243] 使用ExpiFectamine™ 293转染试剂(ThermoFisher Scientific)和5种编码以下序列的独立质粒,在Expi293F细胞中瞬时表达HCMV五聚体。下文描述的HCMV五聚体为约162kDa、无糖基化(包括标签和接头,但不包括信号肽)。

[0244] 核苷酸序列

[0245] 所表达的HCMV五聚体序列代表除了两个引入的突变(一个在gH中,一个在UL128中)外,来自Merlin毒株的天然序列(GenBank:AY446894.2;低传代(即减毒)HCMV毒株)(包含内含子),如下文相关段落中描述的。

[0246] gH-SpyTag-His核苷酸序列(SEQ ID NO.12)

[0247] 在这一序列(SEQ ID NO:12)中,在位置1146处引入沉默突变C>A用于GeneArt®合成,因为该核苷酸周围的天然序列CACCTGC被标记为可能有问题。该构建体包含:信号肽(nt 1-69)、胞外域(nt 70-2151)、跨膜结构域(截短的)(nt 2152-2157)、(信号肽、胞外域和跨膜结构域(截短的)一起由SEQ ID NO:13表示)、接头(nt 2158-2175;SEQ ID NO:14)、SpyTag(nt2176-2214;SEQ ID NO:15)、6x His标签(nt 2215-2232)、终止密码子(nt2233-2235)。核苷酸1至2157(SEQ ID NO:13)代表gH编码序列。

[0248] gL核苷酸序列(SEQ ID NO.16)

[0249] 在这一序列中:信号肽(nt 1-90)、胞外域(nt 91-834)、终止密码子(nt835-837)。

[0250] UL130-C标签核苷酸序列(SEQ ID NO.17)

[0251] 在这一序列中:信号肽(nt 1-75)、胞外域(nt 76-642)、接头(nt 643-687)、C标签(nt 688-699)、终止密码子(nt 700-702)。

[0252] UL128核苷酸序列(SEQ ID NO.20)(包含天然序列中存在的2个内含子)

[0253] 在这一序列中:信号肽(nt 1-81),内含子:nt 165-287、nt 423-542,胞外域外显子(nt 82-164、nt 288-422、nt 543-756),终止密码子(nt 757-759)。

[0254] 在核苷酸634处引入了T>C突变。在GenBank文件中提到T634核苷酸引起Merlin毒株中UL128过早终止,并且因此我们使用了来自不同毒株(GenBank:GQ396662.1,毒株HAN38)的注释来告知替换哪个碱基,以便恢复到全长蛋白的表达。

[0255] UL131A核苷酸序列(SEQ ID NO.21)(包含天然序列中存在的内含子)

[0256] 在这一序列中:信号肽(nt 1-54)、内含子(nt 237-344)、胞外域外显子(nt55-236、nt 345-495)、终止密码子(nt 496-498)。

[0257] SpyCatcher-HBsAg核苷酸序列(SEQ ID NO.22)

[0258] 在这一序列中:SpyCatcherDeltaN1(nt 1-276)、柔性接头(nt 277-303)、PVTN接头(nt 304-315)、HBsAg(nt 316-993)、C标签(nt 994-1005)、终止密码子(nt 1006-1008)。

[0259] 氨基酸序列

[0260] 预计以上核苷酸序列的表达产生以下氨基酸序列。

[0261] gH-SpyTag-His氨基酸序列(SEQ ID NO.27)

[0262] 预计质量81.852kDa(无信号肽),84.364kDa(包含信号肽)。

[0263] 在这一序列中:信号肽(aa 1-23)、胞外域(aa 24-717)、跨膜结构域(截短的)(aa 718-719)、(信号肽、胞外域和跨膜结构域(截短的)一起由SEQ ID NO:28表示)、接头(aa 720-725;SEQ ID NO:29)、SpyTag(aa 726-738;SEQ ID NO:30)、6x His标签(aa 739-744)。氨基酸残基1-719代表具有截短的TM结构域的天然Merlin毒株gH氨基酸序列(SEQ ID NO:

28)。

[0264] gL氨基酸序列(SEQ ID NO:31)

[0265] 预计质量27.522kDa(无信号肽),30.815kDa(包含信号肽)。

[0266] 在这一序列中:信号肽(aa 1-30)、胞外域(aa 31-278)。氨基酸残基1-278代表天然Merlin毒株gL氨基酸序列。

[0267] UL130-C标签氨基酸序列(SEQ ID NO:32)

[0268] 预计质量23.167kDa(无信号肽),26.081kDa(包含信号肽)。

[0269] 在这一序列中:信号肽(aa 1-25)、胞外域(aa 26-214)、(信号肽和胞外域一起由SEQ ID NO:33表示)、接头(aa 215-229;SEQ ID NO:34)、C标签(aa 230-233)。

[0270] 氨基酸残基1-214代表天然Merlin毒株UL130氨基酸序列。

[0271] UL128氨基酸序列(SEQ ID NO:35)

[0272] 预计质量16.659kDa(无信号肽),19.717kDa(包含信号肽)。

[0273] 在这一序列中:信号肽(aa 1-27)、胞外域(aa 28-171)。氨基酸残基1-171代表天然Merlin毒株UL128氨基酸序列。

[0274] UL131A氨基酸序列(SEQ ID NO:36)

[0275] 预计质量12.985kDa(无信号肽),14.989kDa(包含信号肽)。

[0276] 在这一序列中:信号肽(aa 1-18)、胞外域(aa 19-129)。氨基酸残基1-129代表天然Merlin毒株UL131A氨基酸序列。

[0277] SpyCatcher-HBsAg氨基酸序列(SEQ ID NO:37)

[0278] 预计质量36.824kDa,包含标签和接头。

[0279] 在这一序列中:SpyCatcherDeltaN1(aa 1-92;SEQ ID NO:38)、柔性接头(aa 93-101;SEQ ID NO:39)、PVTN接头(aa 102-105;SEQ ID NO:40)、HBsAg(aa 106-331;SEQ ID NO:41)、C标签(aa 332-335)。

[0280] 五聚体的纯化

[0281] 五聚体-SpyTag在EXPI293F细胞中表达,并分泌到上清液中(由于gH亚单位的TM结构域(其一部分)的缺失)。使用亲和纯化来纯化HCMV五聚体的最初尝试依赖于带有C标签的gH亚单位的表达,但这导致了gH/gL异源同源二聚体以及五聚体的分离。在替代策略中,将C标签添加至UL130亚单位(SEQ ID NO:17(核苷酸)和SEQ ID NO:32(氨基酸)),这允许使用C标签亲和纯化(ThermoFisher)和尺寸排阻色谱法从上清液纯化五聚体。当通过SDS-PAGE分析时,五聚体在非还原条件和还原条件下如预期出现(图1A),并与抗HCMV五聚体抗体(Native Antigen Company(AbCMV2450))反应(图1B),仅在~14kDa处观察到少量污染物。

[0282] HBsAgVLP单体的纯化

[0283] 将SpyCatcher-HBsAg在巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)中表达,并从细胞匀浆纯化。在还原条件下在SDS-PAGE凝胶上,主要的蛋白条带对应于单体的预期大小(约37kDa),更大的条带表明存在寡聚体物质,表明粒子发生了良好的交联(图2A,泳道'R')。在非还原条件下(泳道'NR'),物质主要保留在凝胶的顶部,有一些拖尾(smearing),这表明VLP粒子形成良好,并且因此太大,无法完全迁移到凝胶中(图2A)。非还原和还原的SpyCatcher-HBsAg都与小鼠抗HBsAg单克隆抗体(从Bio-Rad获得(MCA4658))强烈反应(图2B),表明SpyCatcher的存在没有对反应性表位产生负面影响。在s200increase 3.2/300柱

上,通过HPLC尺寸排阻分析评估,HCMV五聚体-SpyTag和SpyCatcher-HBsAg均作为单一峰洗脱(图3A-3B)。HCMV五聚体-SpyTag在约～400kDa洗脱(图3A),这比预期的大。然而,这可以用五聚体不是球形的结构来解释,已知这种结构会改变蛋白在尺寸排阻色谱过程中的保留时间。SpyCatcher-HBsAg在柱的外水体积中洗脱,这表明粒子正确形成,在溶液中没有可检测到的单体(图3B)。

[0284] 抗原-VLP缀合

[0285] 将HCMV五聚体-SpyTag与SpyCatcher-HBsAg在4℃缀合过夜,得到包被有HCMV五聚体的HBsAg VLP。补充有5mM EDTA的含有Tris缓冲盐水(TBS:20mM Tris和150mM NaCl,pH 7.4)的缓冲液用于缀合。使用SDS-PAGE和蛋白印迹分析以及HPLC来监测缀合。当将缀合反应物与单独的五聚体-SpyTag或SpyCatcher-HBsAg比较时,在还原条件下在～130kDa处存在新的条带(图4A,泳道2),其与单克隆抗HBsAg(图4B)和多克隆抗HCMV五聚体(图4C)抗体均有反应,表明其至少含有缀合的HBsAg-gH。当通过HPLC尺寸排阻色谱法分析时,主峰中97%的洗脱物对应于缀合的HCMV五聚体-HBsAg单体的预计大小(图5)。

[0286] 实施例2

[0287] HCMV-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg VLP(有佐剂)的体内测试

[0288] 在使用BALB/c小鼠的免疫接种方案中使用缀合的HCMV五聚体-HBsAg VLP以及非缀合的HCMV五聚体-SpyTag,以(i)确认所产生的HCMV五聚体-SpyTag的免疫原性,以及(ii)比较非缀合的HCMV五聚体-SpyTag与缀合的HCMV五聚体-HBsAg VLP的免疫原性。

[0289] 使用如下的具有3周间隔的初免-加强-加强方案:

[0290] 第0天:免疫接种(初免);第20天:尾部取血;第21天:免疫接种(加强1);第41天:尾部取血;第42天:免疫接种(加强2);第63天:心脏取血。

[0291] 所免疫的组如下。对于每个组n＝10:

[0292] 1)AddaVax™(Invivogen)中1μg HCMV五聚体-SpyTag

[0293] 2)AddaVax™中1μg HCMV五聚体-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg VLP(1μg五聚体等效物)

[0294] 3)AddaVax™中SpyCatcher-HBsAg VLP(针对第2组中SpyCatcher-HBsAg的量归一化)

[0295] 4)AddaVax™中0.1μg HCMV五聚体-SpyTag

[0296] 5)AddaVax™中0.1μg HCMV五聚体-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg VLP(0.1μg五聚体等效物)

[0297] 6)TBS(20mM Tris和150mM NaCl,pH 7.4)

[0298] AddaVax™是一种配方类似于MF59®的基于角鲨烯的水包油纳米乳液,已在欧洲获得流感疫苗佐剂许可。已知角鲨烯水包油乳液引发细胞(Th1)和体液(Th2)免疫应答。其他合适的佐剂将是本领域技术人员已知的。

[0299] 免疫原性使用ELISA来评估。使用针对HCMV五聚体的标准化ELISA来确定各组中产生的抗血清的滴度。用50μL/孔的5μg/ml五聚体(无SpyTag)包被平板过夜;洗涤;用牛奶封闭1小时;洗涤;施加小鼠血清(在PBS中适当稀释)1小时;洗涤;施加山羊抗小鼠-碱性磷酸酶抗体(1:10,000)1小时;洗涤;显色。

[0300] 包括不同剂量的非缀合的(第1组和第4组)和缀合的HCMV五聚体-HBsAg(第2组和

第5组),以允许在缀合的HCMV五聚体-HBsAg VLP疫苗和非缀合的HCMV五聚体-SpyTag之间比较免疫原性,这允许外推到其他HCMV五聚体疫苗(例如可溶性五聚体)。第3组和第6组代表阴性对照。

[0301] 在每个时间点,在适当的稀释度读取样品的OD值,并且使用在每个板上运行的标准曲线确定ELISA单位。显示第1组、第2组、第4组和第5组在初免后的结果的数据在图6中示出。与用1μg或0.1μg剂量的非缀合的HCMV五聚体免疫的小鼠相比,使用1μg和0.1μg剂量的HCMV五聚体-HBsAg免疫的小鼠显示出明显更强的血清IgG抗体反应。第3组和第6组的ELISA单位提供了该测定的基线,也在图6中示出。

[0302] 使用基于Wang等人(Vaccine 33(2015)7254-7261;DOI:10.1016/j.vaccine.2015.10.110)的微中和测定研究了所产生的抗体的功能活性。第1组、第2组、第4组和第5组的中和滴度在图7中示出。来自用五聚体-HBsAg VLP免疫的小鼠的血清比用单独的五聚体-SpyTag蛋白免疫的小鼠的血清明显更具中和作用。

[0303] 实施例3

[0304] 稳定的构建体序列

[0305] 两种稳定的构建体(改编自Hofmann等人,(2015)Biotech and Bioeng,112(12):2505-2515)被优化用于HCMV五聚体-SpyTag的组分的CHO表达。从HCMV五聚体序列去除了内含子,但保留了信号序列。

[0306] HCMV gH-SpyTag/gL稳定表达构建体

[0307] 稳定的载体构建体HCMV-gH-$(GSG)_2$-SpyTag-His-IRES-gL被设计成包含分别在EV71 IRES的上游和下游的gH-SpyTag-His组分(SEQ ID NO:42)和gL组分(SEQ ID NO:43)。该构建体中使用的编码序列在下文描述。

[0308] 核苷酸序列

[0309] gH-(GSG)2-SpyTag-His(无内含子)(SEQ ID NO:42)插入EV71 IRES上游

[0310] 在这一序列中:信号肽(nt 1-69)、胞外域(nt 70-2151)、截短的跨膜结构域(nt 2152-2157)、$(GSG)_2$接头(nt 2158-2175)、SpyTag(nt 2176-2214)、His-标签(nt 2215-2232)、终止密码子(nt 2233-2235)。

[0311] gL(无内含子)(SEQ ID NO:43)插入EV71 IRES下游

[0312] 在这一序列中:信号肽(nt 1-90)、胞外域(nt 91-834)、终止密码子(nt835-837)。

[0313] HCMV UL128/UL130/UL131A稳定表达构建体

[0314] 将稳定的构建体HCMV-UL128-IRES-UL130-(G4S)3-C标签-IRES-UL131A设计成包含UL128组分(SEQ ID NO:44)、UL130组分(SEQ ID NO:45)和UL131A组分(SEQ ID NO:46)。UL130组分插入在质粒的第一个EV71 IRES之后,并且UL131A组分插入在第二个EV71 IRES之后。该构建体中使用的编码序列在下文描述。

[0315] 核苷酸序列

[0316] U1128(无内含子)(SEQ ID NO:44)

[0317] 在这一序列中:信号肽(nt 1-81)、胞外域(nt 82-513)、终止密码子(nt514-516)。

[0318] UL130-(G4S)3-C标签(无内含子)(SEQ ID NO:45)

[0319] 在这一序列中:信号肽(nt 1-75)、胞外域(nt 76-642)、$(G4S)_3$接头(nt643-687)、C标签(nt 688-699)、终止密码子(nt 700-702)。

[0320] UL131A(无内含子)(SEQ ID NO:46)

[0321] 在这一序列中:信号肽(nt 1-54)、胞外域(nt 55-387)、终止密码子(nt388-390)。

[0322] 实施例4

[0323] HCMV-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg VLP(无佐剂)的体内检测

[0324] 缀合的HCMV五聚体-HBsAg VLP以及非缀合的HCMV五聚体-SpyTag,被用于使用BALB/c小鼠的免疫方案,以进一步研究缀合的五聚体-HBsAg VLP对比非缀合的五聚体-SpyTag蛋白的免疫原性。

[0325] 使用如下的具有3周间隔的初免-加强-加强方案:

[0326] 第0天:免疫接种(初免);第20天:尾部取血;第21天:免疫接种(加强1);第41天:尾部取血;第42天:免疫接种(加强2);第63天:心脏取血。

[0327] 所免疫的组如下。对于每个组n=10:

[0328] 1)1μg HCMV五聚体-SpyTag,无佐剂

[0329] 2)1μg HCMV五聚体-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg VLP(1μg五聚体等效物),无佐剂

[0330] 3)0.1μg HCMV五聚体-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg VLP(0.1μg五聚体等效物),无佐剂

[0331] 免疫原性使用ELISA来评估。使用针对HCMV五聚体的标准化ELISA来确定各组中产生的抗血清的滴度。用50μL/孔的5μg/ml五聚体(无SpyTag)包被平板过夜;洗涤;用牛奶封闭1小时;洗涤;施加小鼠血清(在PBS中适当稀释)1小时;洗涤;施加山羊抗小鼠-碱性磷酸酶抗体(1:10,000)1小时;洗涤;显色。

[0332] 在每个时间点,在适当的稀释度读取样品的OD值,并且使用在每个板上运行的标准曲线确定ELISA单位。初免后和加强后的数据在图8中示出。与用作为可溶性蛋白的单独的1μg HCMV五聚体免疫的小鼠相比,使用1μg和0.1μg剂量的HCMV五聚体-HBsAg免疫的小鼠均显示出明显更强的血清IgG抗体反应。

[0333] 使用基于Wang等人(2015)的微中和测定研究了所产生的抗体的功能活性。初免后和加强后的中和滴度在图9中示出。来自用无佐剂的五聚体-HBsAg VLP免疫的小鼠的血清比用无佐剂的单独的五聚体-SpyTag蛋白免疫的小鼠的血清明显更具中和作用。

[0334] 实施例5

[0335] RSV-F-SpyTag的表达和纯化

[0336] 将来自抗原RSV-F Sc9-10 DS-Cav1 A149C Y458C的序列融合至SpyTag以产生RSV-F-SpyTag,并使用ExpiCHO™表达系统试剂盒和ExpiFectamine™转染试剂(ThermoFisher Scientific),通过用含有核苷酸序列SEQ ID NO:47的质粒pcDNA3.4瞬时转染ExpiCHO™细胞来表达。

[0337] RSV-F Sc9-10 DS-Cav1 A149C Y458C(美国国立卫生研究院(National Institutes of Health))是如Joyce等人(2016)(Iterative structure-based improvement of a respiratory syncytial virus fusion glycoprotein vaccine.Nat Struct Mol Biol.2016Sep;23(9):811-820)所描述的呼吸道合胞体病毒融合蛋白(预融合RSV-F)的变体。该变体是预融合稳定化形式的融合(F)糖蛋白,具有遗传连接的F亚单位、缺失的融合肽、T4 fibritin三聚化基序(折叠结构域)以及由另外的原聚体间二硫键(A149C Y458C)稳定化的原聚体间运动。

[0338] 核苷酸序列

[0339] RSV-F-SpyTag-C标签核苷酸序列(SEQ ID NO:47)

[0340] 通过在3'末端缺失凝血酶位点、6x His-标签和Strep-tag®II对Sc9-10DS-Cav1 A149C Y458C的原始序列进行了修饰。这些缺失的结构域被接头-SpyTag-C标签序列替代,以产生1587nt的盒(SEQ ID NO:47),该盒包含Sc9-10 DS-Cav1 A149C Y458C(nt 1-1515,包含信号肽(nt 1-75)和T4 fibritin foldon结构域(nt 1435-1515))、$(GSG)_2$接头(nt 1516-1533;SEQ ID NO:14)、SpyTag(nt 1534-1572;SEQ ID NO:15)、C标签(nt 1573-1584)和终止密码子(nt 1585-1587)。不包含接头、SpyTag、C标签和终止密码子的Sc9-10DS-Cav1 A149C Y458C核苷酸序列被包含在SEQ ID NO:48中。不包含信号肽、接头、SpyTag或C标签的Sc9-10 DS-Cav1 A149C Y458C核苷酸序列被包含在SEQ ID NO:49中。

[0341] 氨基酸序列

[0342] 预计核苷酸序列SEQ ID NO:47的表达产生具有以下结构域的RSV-F-SpyTag-C标签氨基酸序列(SEQ ID NO:50):Sc9-10 DS-Cav1 A149CY458C((aa 1-505,包含信号肽(aa 1-25)和foldon结构域(aa 479-505))、接头(aa 506-511;SEQ ID NO:29)、SpyTag(aa 512-524;SEQ ID NO:30)、C标签(aa 525-528)。具有信号肽的蛋白的预计质量为57.9kDa,无信号肽的蛋白的预计质量为55.3kDa。不包含接头、SpyTag或C标签的Sc9-10DS-Cav1 A149C Y458C氨基酸序列被包含在SEQ ID NO:51中。不包含信号肽、接头、SpyTag或C标签的Sc9-10 DS-Cav1 A149C Y458C氨基酸序列被包含在SEQ ID NO:52中。

[0343] RSV-F-SpyTag的纯化

[0344] RSF-F-SpyTag抗原从细胞分泌,并使用C标签亲和纯化和尺寸排阻色谱法从上清液纯化。当通过SDS-PAGE分析(图10A)并与抗RSV-F[2F7]单克隆抗体(ab43812;Abcam)反应(图10B)时,RSV-F-SpyTag在非还原条件和还原条件下如预期出现。

[0345] HBsAg VLP单体的纯化

[0346] 如上文实施例1中描述的制备并纯化SpyCatcher-HBsAg(VLP单体),另参见图2。

[0347] RSV-F-SpyTag与SpyCatcher-HBsAg的缀合

[0348] 将RSV-F-SpyTag与SpyCatcher-HBsAg在4℃缀合过夜,得到包被有RSV-F三聚体的HBsAg VLP(RSV-F-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg)。含有Tris缓冲盐水(TBS:20mM Tris和150mM NaCl,pH 7.4)的缓冲液用于缀合。使用SDS-PAGE和蛋白印迹分析来监测缀合(图11)。当将缀合反应物与单独的RSV-F-SpyTag或SpyCatcher-HBsAg比较时,在还原条件下在~105kDa处存在新的条带(图11A),其与抗HBsAg单克隆抗体(MCA4658,Bio-Rad)(图11B)和抗RSV-F[2F7]单克隆抗体(ab43812;Abcam)(图11C)均有反应,表明其含有缀合的RSV-F-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg。

[0349] 实施例6

[0350] 缀合的RSV-F-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg的免疫原性

[0351] 设计了使用BALB/c小鼠的免疫程序,以确认所产生的RSV-F抗原的免疫原性,并比较缀合的RSV-F-SpyTag--SpyCatcher-HBsAg VLP与非缀合的RSV-F-SpyTag蛋白的免疫原性。对各组基于样品中RSV-F-SpyTag的量给药,并选择具有3周间隔的初免-加强方案,最终时间点在加强免疫后2周。

[0352] 无论疫苗是无佐剂的(图6)还是用Addavax™配制的(图6),用RSV-F-SpyTag--

SpyCather-HBsAg免疫的初免后小鼠与用单独的RSV-F-SpyTag蛋白免疫的小鼠相比,表现出明显更强的血清IgG抗体反应。

[0353] 序列的表格

序列	核苷酸序列	氨基酸序列
柔性接头 2 - $(GSG)_2$	n/a	SEQ ID NO: 1
柔性接头 3 - $(GSG)_3$	n/a	SEQ ID NO: 2
柔性接头 4 - $(G4S)_1$	n/a	SEQ ID NO: 3
柔性接头 5 - $(G4S)_3$	n/a	SEQ ID NO: 4
柔性接头 6 - $(G4S)_4$	n/a	SEQ ID NO: 5
柔性接头 7	n/a	SEQ ID NO: 6
柔性接头 8	n/a	SEQ ID NO: 7
柔性接头 9	n/a	SEQ ID NO: 8
刚性接头 1	n/a	SEQ ID NO: 9
刚性接头 2 - $(EAAAK)_3$	n/a	SEQ ID NO: 10
刚性接头 3 - $(AP)_7$	n/a	SEQ ID NO: 11
gH-SpyTag-His	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 27
具有截短的跨膜结构域的gH	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 28
来自gH构建体的接头(2158-2175 bp)	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 29
SpyTag (2176-2214bp)	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 30
gL	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 31
UL130-C标签	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 32
U130 (信号序列和胞外域)	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 33
来自UL130构建体的接头	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 34
UL128 (包含2个内含子)	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 35
UL131A (包含内含子)	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 36
SpyCatcher-HBsAg	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 37
SpyCatcherDeltaN1	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 38
来自SpyCatcher-HBsAg的柔性接头	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 39
来自SpyCatcher-HBsAg的PVTN接头	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 40
HBsAg	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 41
针对CHO表达优化的gH-SpyTag-His	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO:27
针对CHO表达优化的gL	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 31
针对CHO表达优化的UL128	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 35
针对CHO表达优化的UL130	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 32
针对CHO表达优化的UL131	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 36
RSV-F-SpyTag-C标签	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 50
Sc-9-10 DS-Cav1 A149C Y458C (RSV-F)	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 51
无信号肽的Sc-9-10 DS-Cav1 A149C Y458C	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 52
RSV-F DS-Cav1-SpyTag-C标签	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 56
RSV-F DS-Cav1	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 57
无信号肽的RSV-F DS-Cav1	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 58
无信号肽的具有截短的跨膜结构域的gH	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 60

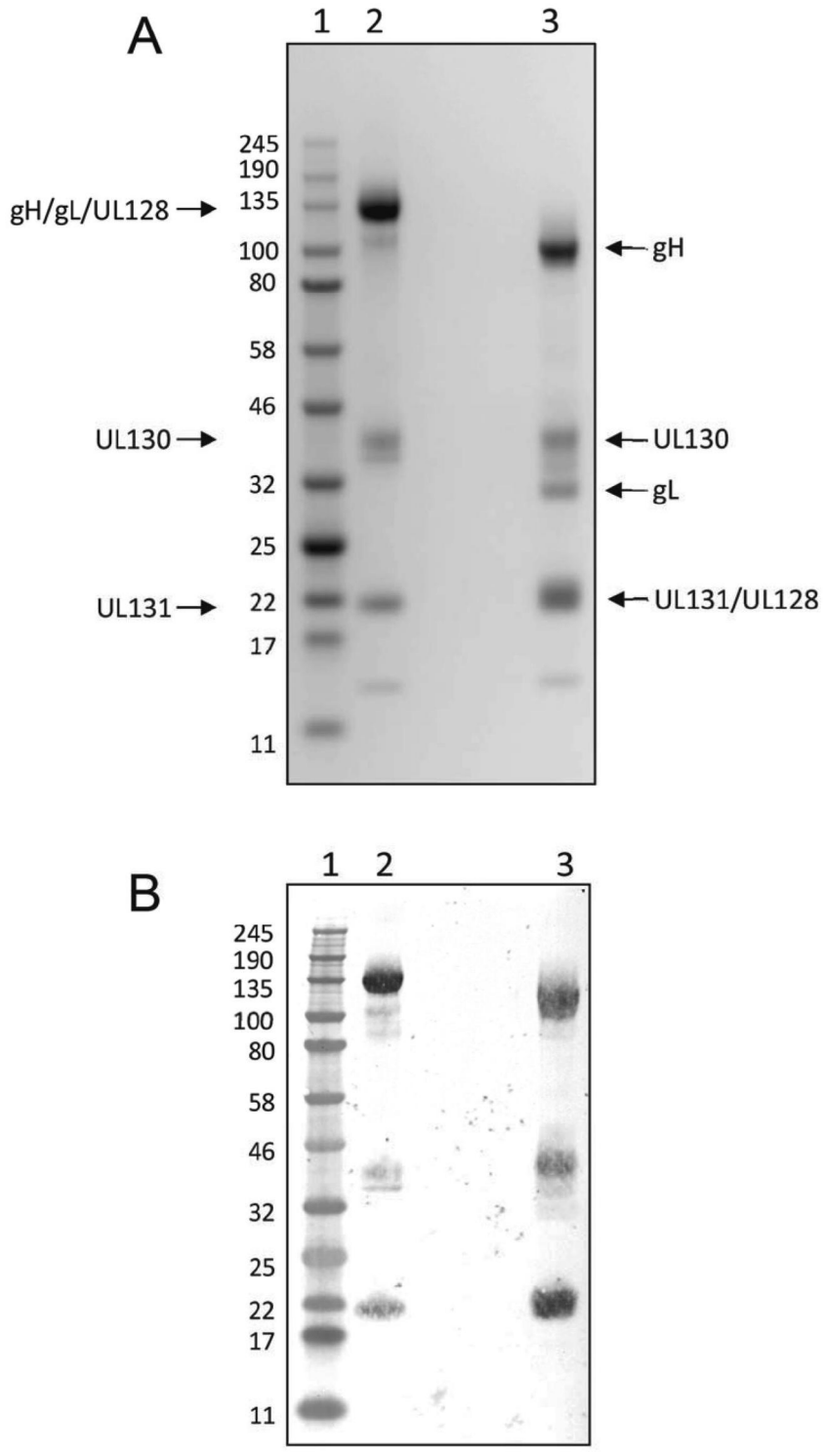

A
1
2
3
245
190
135
100
80
58
46
32
25
22
17
11
gH/gL/UL128
UL130
UL131
gH
UL130
gL
UL131/UL128
B
1
2
3
245
190
135
100
80
58
46
32
25
22
17
11

图1

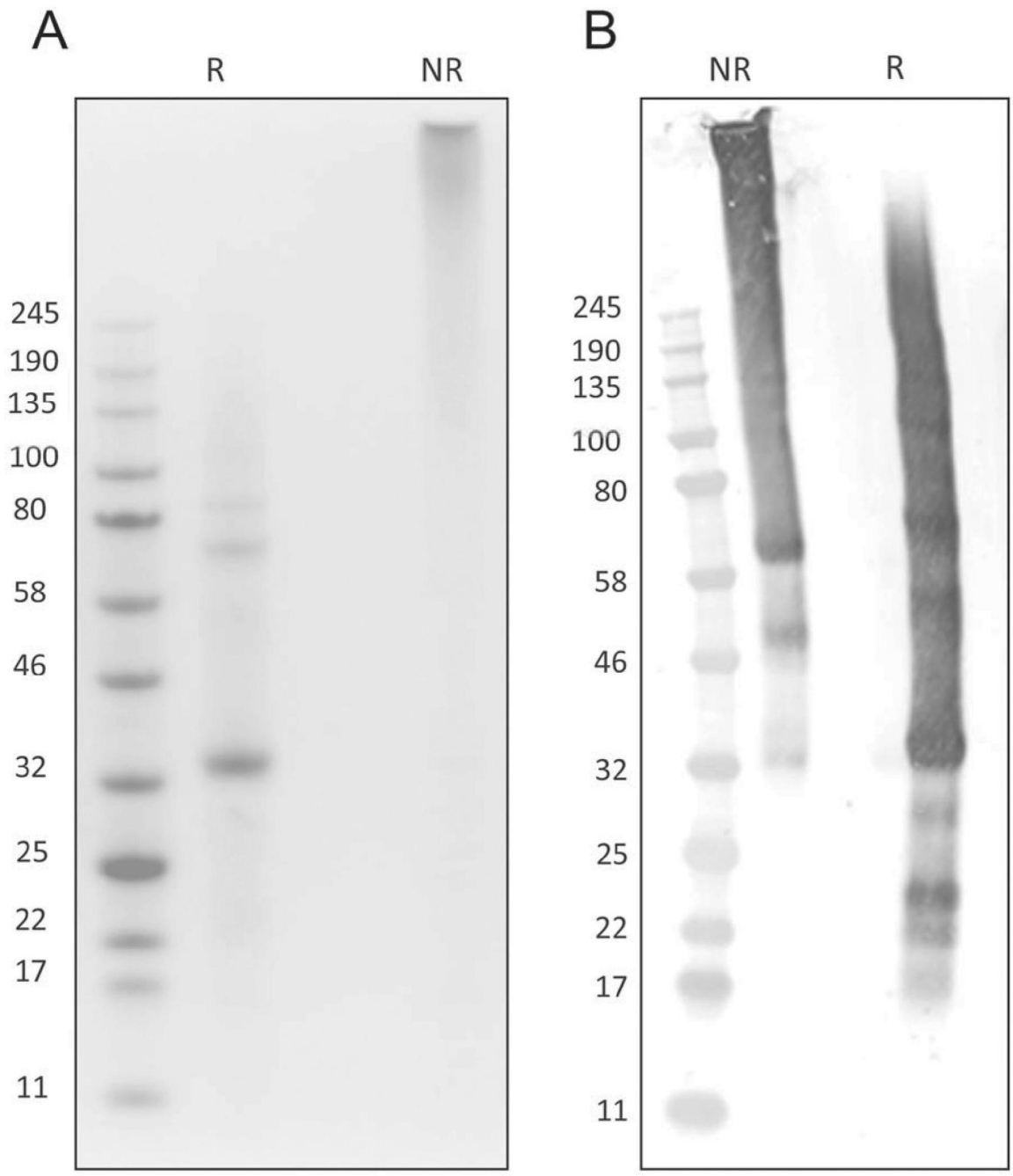

A
R
NR
245
190
135
100
80
58
46
32
25
22
17
11
B
NR
R
245
190
135
100
80
58
46
32
25
22
17
11

图2

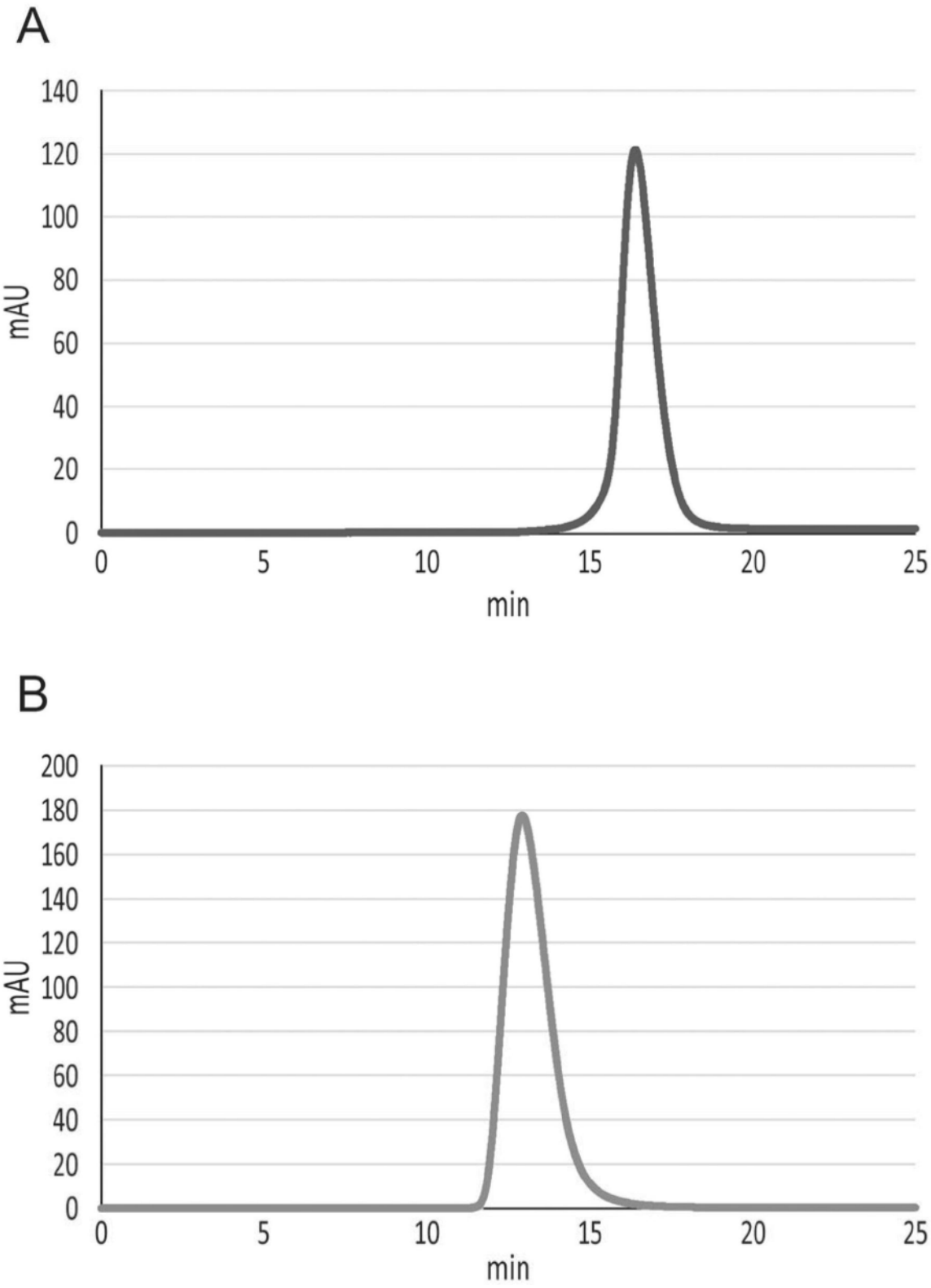

A
140
120
100
80
60
40
20
0
mAU
0
5
10
15
20
25
min
B
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
mAU
0
5
10
15
20
25
min

图3

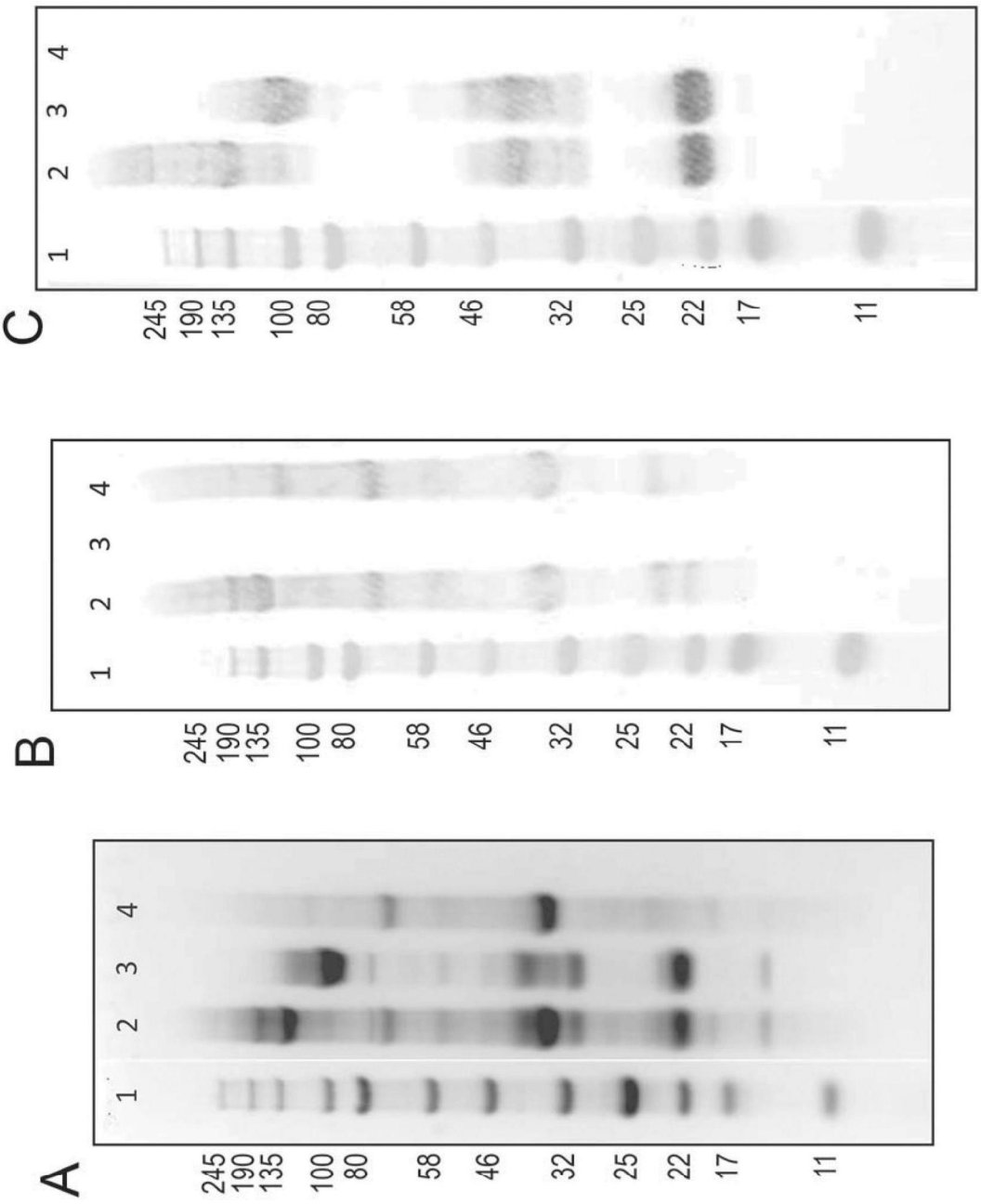

C
1
2
3
4
245
190
135
100
80
58
46
32
25
22
17
11
B
1
2
3
4
245
190
135
100
80
58
46
32
25
22
17
11
A
1
2
3
4
245
190
135
100
80
58
46
32
25
22
17
11

图4

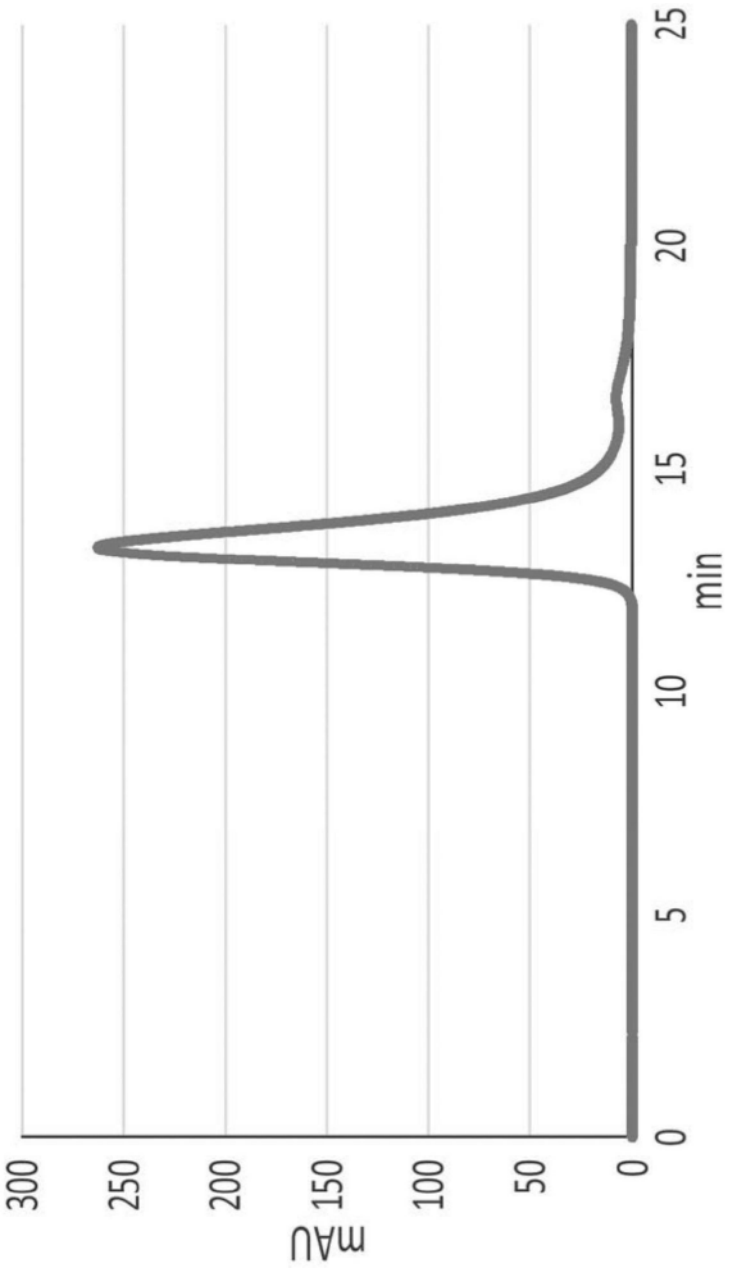


图5

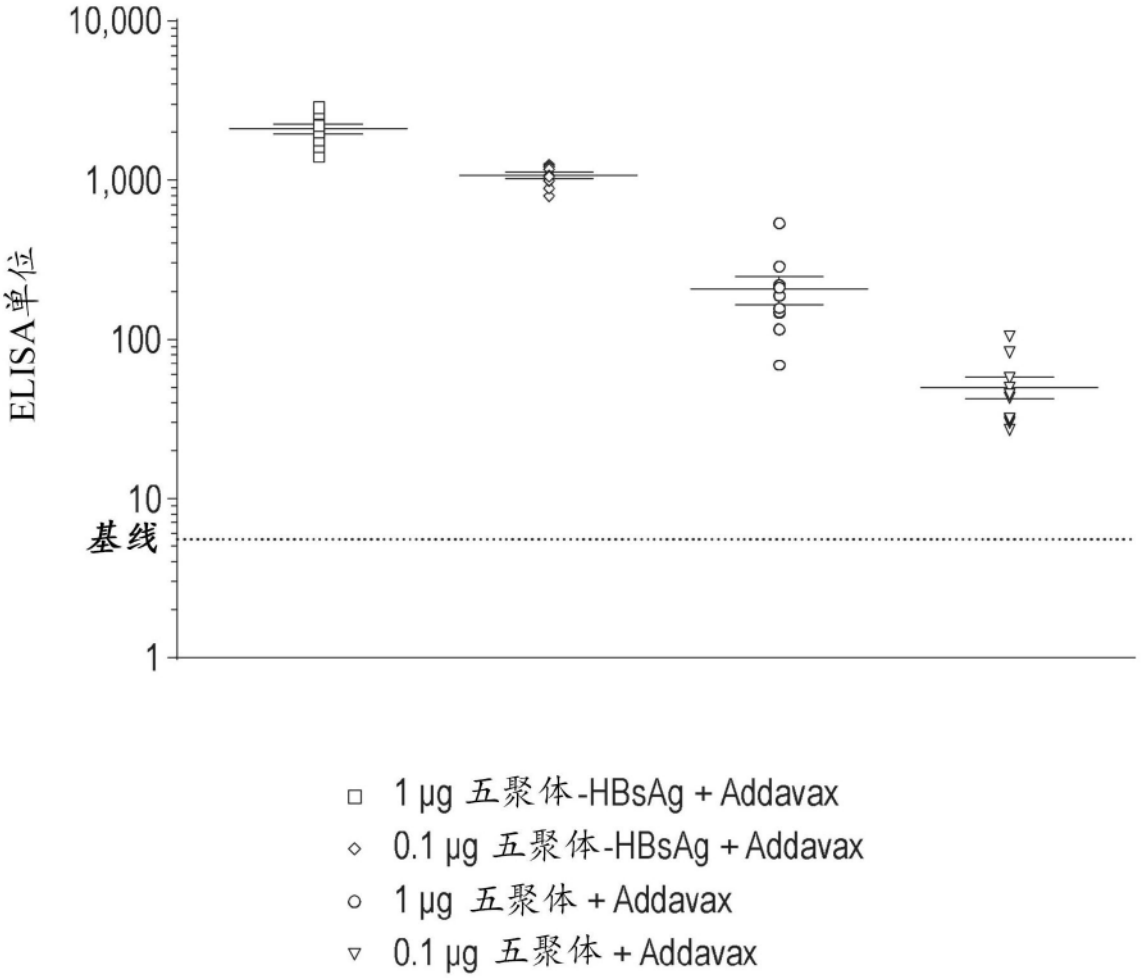

10,000
1,000
100
10
1
基线
ELISA单位
1 μg 五聚体-HBsAg + Addavax
0.1 μg 五聚体-HBsAg + Addavax
1 μg 五聚体 + Addavax
0.1 μg 五聚体 + Addavax

图6

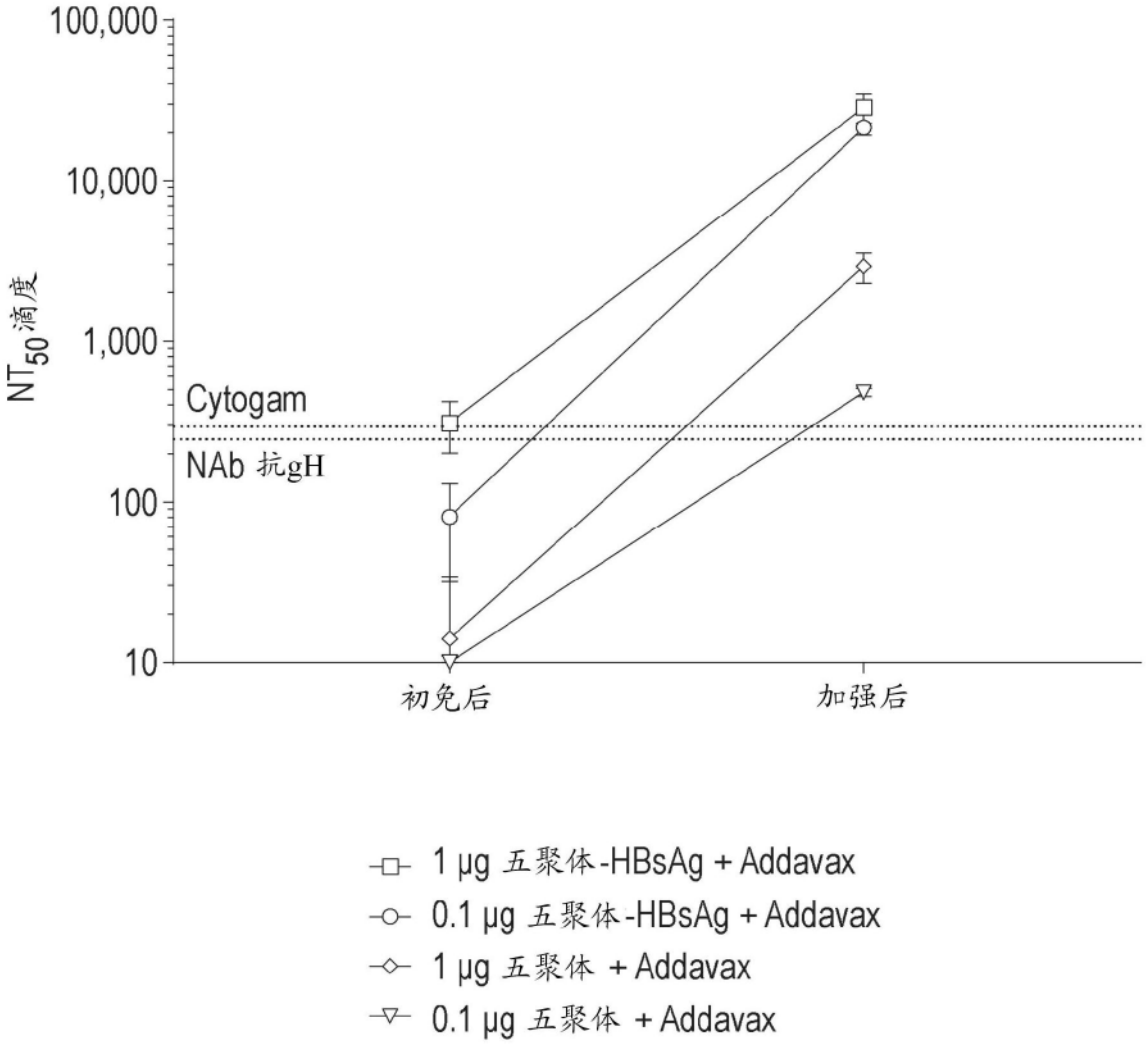
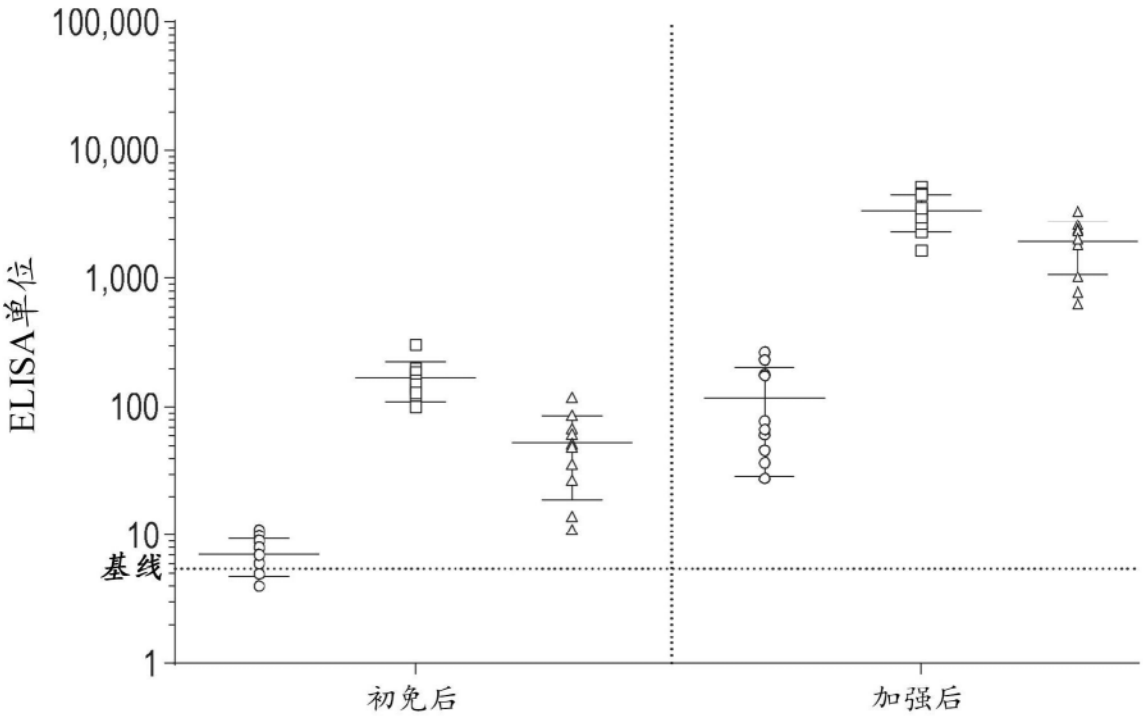

100,000
10,000
1,000
100
10
NT50滴度
Cytogam
NAb 抗gH
初免后
加强后
1 μg 五聚体-HBsAg + Addavax
0.1 μg 五聚体-HBsAg + Addavax
1 μg 五聚体 + Addavax
0.1 μg 五聚体 + Addavax

图7



○ 1 μg 五聚体，无佐剂
□ 1 μg 五聚体-HBsAg，无佐剂
△ 0.1 μg 五聚体-HBsAg，无佐剂

图8

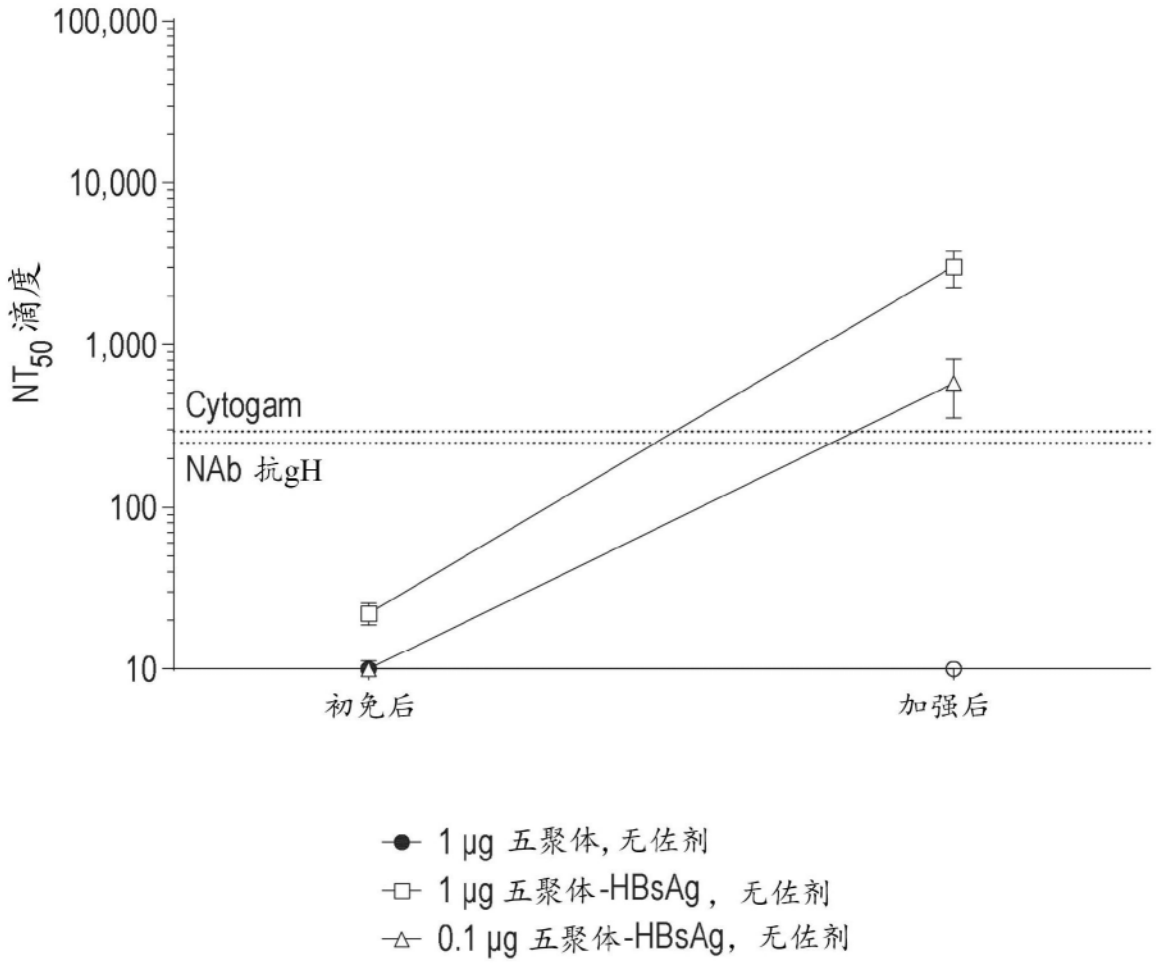

100,000
10,000
1,000
100
10
NT50 滴度
Cytogam
NAb 抗gH
初免后
加强后
1 μg 五聚体，无佐剂
1 μg 五聚体-HBsAg，无佐剂
0.1 μg 五聚体-HBsAg，无佐剂

图9

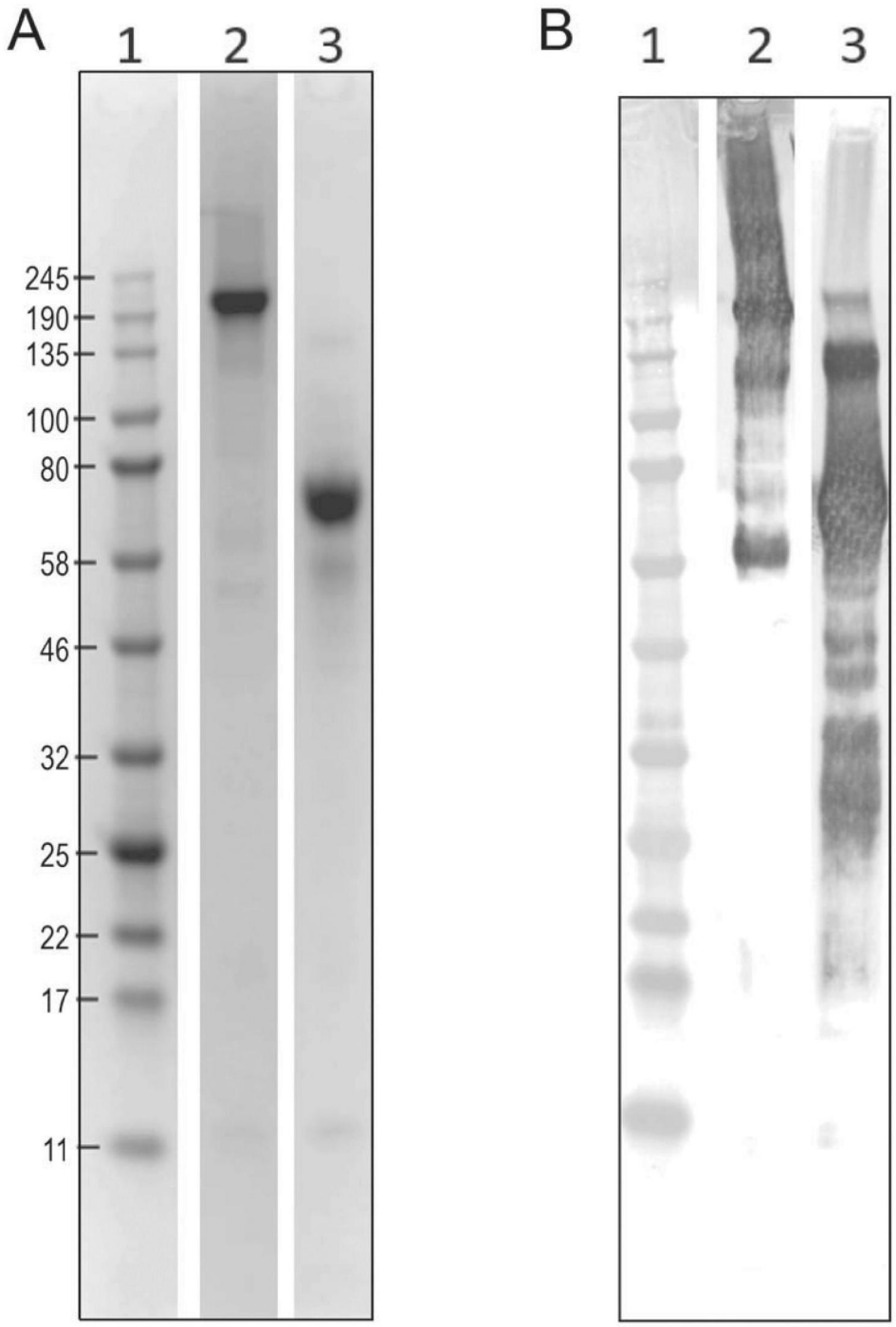


图10

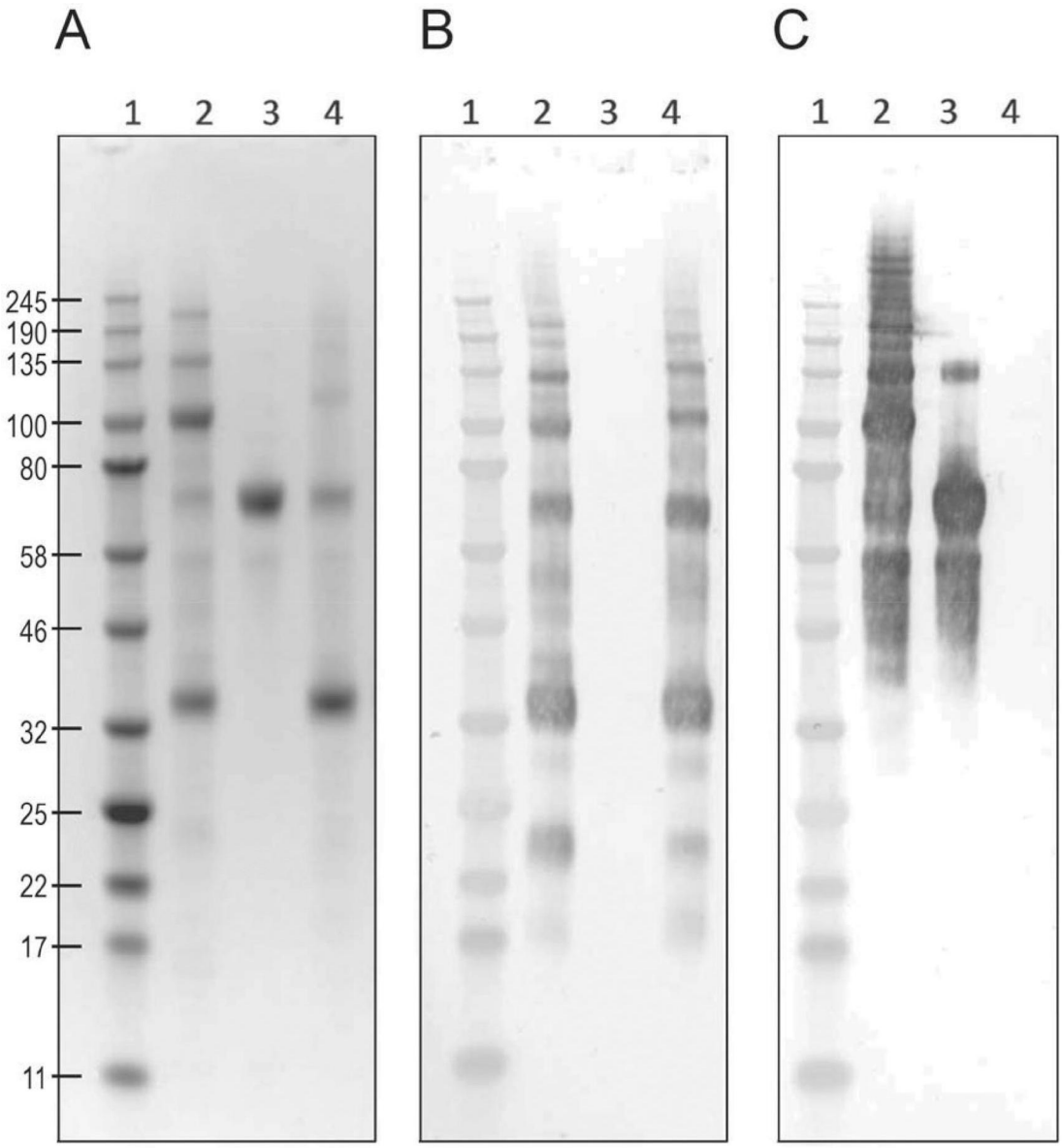


图11

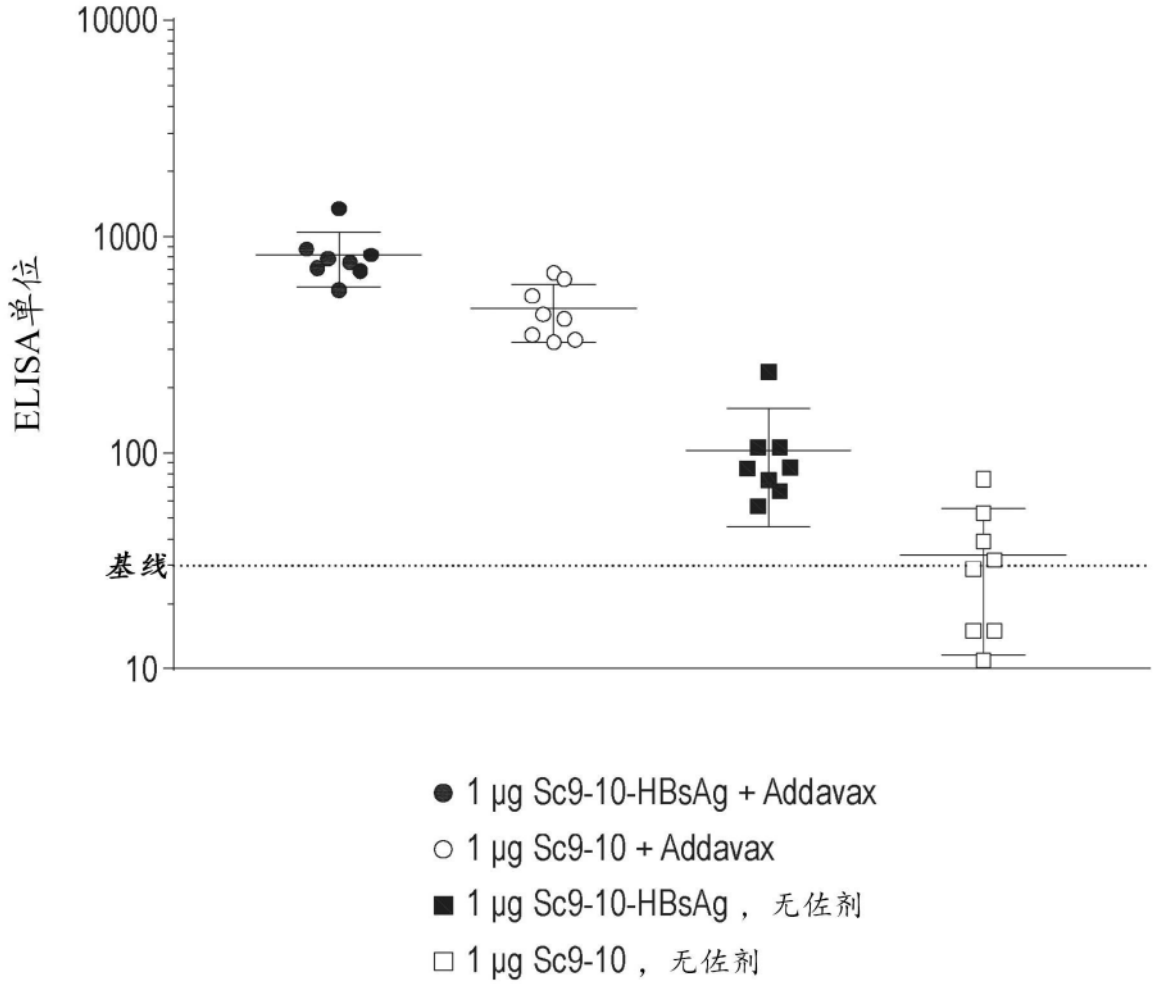

10000
1000
100
基线
10
ELISA单位
● 1 μg Sc9-10-HBsAg + Addavax
○ 1 μg Sc9-10 + Addavax
■ 1 μg Sc9-10-HBsAg，无佐剂
□ 1 μg Sc9-10，无佐剂

图12